

レーザ加工によるマイクロ流体デバイスの作製と血液検査への応用に関する研究

| | |
|---------|---|
| 著者 | 山田 博之 |
| 学位授与大学 | 東洋大学 |
| 取得学位 | 博士 |
| 学位の分野 | 工学 |
| 報告番号 | 甲第231号 |
| 学位授与年月日 | 2009-03-25 |
| URL | http://id.nii.ac.jp/1060/00003956/ |

2008 年 度

学 位 論 文

レーザー加工によるマイクロ流体デバイスの作製と
血液検査への応用に関する研究

東洋大学大学院
工学研究科 機能システム専攻
博士後期課程 43A0060003 登

山 三 博 之

2008年度

学位論文

レーザ加工によるマイクロ流体デバイスの作製と
血液検査への応用に関する研究

東洋大学大学院
工学研究科 機能システム専攻
博士後期課程 46A0060003 番

山田 博之

目 次

| | |
|---|----|
| 第1章 序論 | 1 |
| 1.1 本研究の背景 | 1 |
| 1.1.1 マイクロ加工技術の現状 | 1 |
| 1.1.2 μ T A Sの特徴と研究動向 | 3 |
| A. μ T A Sの特徴 | 3 |
| B. μ T A Sの研究動向 | 5 |
| C. μ T A Sの現状 | 8 |
| 1.1.3 μ T A Sの作製方法および課題 | 9 |
| A. μ T A Sの作製方法 | 9 |
| B. μ T A Sの課題 | 11 |
| 1.1.4 血液検査への μ T A Sの応用と発展 | 12 |
| 1.2 本研究の目的と意義 | 17 |
| 1.3 本論文の構成と概要 | 20 |
| 参考文献 | 21 |
| 第2章 マイクロ加工技術とマイクロ流路作製技術 | 25 |
| 2.1 緒言 | 25 |
| 2.2 実験装置および材料 | 27 |
| 2.3 レーザによるラミネートフィルムへのマイクロ加工技術 | 32 |
| 2.3.1 熱硬化性ラミネートフィルムへのレーザ加工 | 32 |
| 2.3.2 レーザによる微細溝加工 | 36 |
| 2.4 レーザによるフッ素樹脂へのマイクロ加工技術 | 38 |
| 2.4.1 フッ素樹脂への溝加工 | 38 |
| 2.4.2 材料温度によるレーザ加工への影響 | 43 |
| 2.4.3 フッ素樹脂加工面の表面平滑化 | 44 |
| 2.4.4 フッ素樹脂への微小穴加工 | 46 |
| 2.4.5 フーリエ変換赤外分光法による評価 | 48 |
| 2.4.6 濡れ性試験による評価 | 50 |
| 2.5 マイクロ流路の作製方法 | 51 |
| 2.5.1 レーザ加工と樹脂ラミネート法によるマイクロ流体デバイス作製プロセス | 51 |
| 2.5.2 マイクロ流路の作製 | 53 |
| 2.6 結言 | 56 |
| 参考文献 | 58 |

| | |
|---|-----|
| 第3章 血液検査用マイクロ流体デバイスの作製 | 59 |
| 3.1 緒言 | 59 |
| 3.2 三又構造マイクロ流路を用いた血球整列 | 61 |
| 3.2.1 三又構造マイクロ流路のマイクロ流体デバイスの作製 | 61 |
| 3.2.2 インクを用いた送液実験 | 63 |
| 3.2.3 血液を用いた送液実験と血球整列 | 64 |
| 3.3 小径パイプを挿入したマイクロ流路を用いた血球整列 | 66 |
| 3.3.1 流体解析を用いた小径パイプ挿入流路の流路設計 | 66 |
| 3.3.2 小径パイプを挿入したマイクロ流体デバイスの作製 | 71 |
| 3.3.3 血液を用いた送液実験と血球整列 | 73 |
| 3.4 2段階合流流路を用いた血球整列 | 75 |
| 3.4.1 流体解析を用いた流路設計 | 75 |
| 3.4.2 2段階合流の3次元立体流路の作製 | 79 |
| 3.4.3 血液を用いた送液実験と血球整列 | 83 |
| 3.5 フッ素樹脂を用いた血球変形能観察用マイクロ流体デバイス | 84 |
| 3.5.1 擬似毛細血管流路とマイクロ流体デバイスの作製 | 84 |
| 3.5.2 血液を用いた送液実験と赤血球変形能の観察 | 90 |
| 3.6 重力を利用した流体駆動方法 | 92 |
| 3.6.1 接続チューブの高低差による流体駆動と血球整列 | 92 |
| A. 流体解析による流路の設計 | 92 |
| B. 接続チューブの高低差による流体駆動と血球整列 | 95 |
| 3.6.2 重力駆動部集積型マイクロ流体デバイスの作製 | 97 |
| A. 作製方法と実験方法 | 97 |
| B. 小径ビーズとインクを用いた予備実験の結果および考察 | 99 |
| 3.6.3 三又構造マイクロ流路における血球整列と流路形状の最適化 | 100 |
| A. 重力駆動による血球整列と流路幅寸法との関係 | 100 |
| B. 重力駆動による血球整列と流路高さとの関係 | 103 |
| 3.6.4 小径パイプ流路と重力駆動 | 106 |
| A. 作製方法と実験方法 | 106 |
| B. 血液を用いた重力駆動実験の結果および考察 | 107 |
| 3.6.5 複合流路における重力駆動と血球変形能観察 | 108 |
| A. 三又構造流路と擬似毛細血管流路との複合流路の作製 | 108 |
| B. 複合流路の重力駆動実験の結果および考察 | 113 |
| 3.7 結言 | 115 |
| 参考文献 | 118 |

| | |
|--------------------------------|-----|
| 第4章 血球計数デバイスの開発 | 119 |
| 4.1 緒言 | 119 |
| 4.2 小径ファイバ端面の研磨加工技術 | 121 |
| 4.3 小径ファイバを挿入したマイクロ流体デバイスの作製 | 124 |
| 4.4 受光用電子回路の作製とレーザによる予備実験 | 128 |
| 4.4.1 受光用電子回路の作製と小径ビーズを用いた検出実験 | 128 |
| 4.4.2 血液を用いた検出実験 | 130 |
| 4.4.3 高感度受光用電子回路による血球検出実験 | 131 |
| 4.5 マイクロ流体デバイスを用いた検出実験 | 134 |
| 4.5.1 シングルファイバによる血球検出 | 134 |
| 4.5.2 ダブルファイバによる検出精度の向上と流速測定 | 137 |
| 4.6 結言 | 141 |
| 参考文献 | 143 |
| 第5章 結論 | 144 |
| 謝辞 | 150 |
| 業績一覧 | 151 |

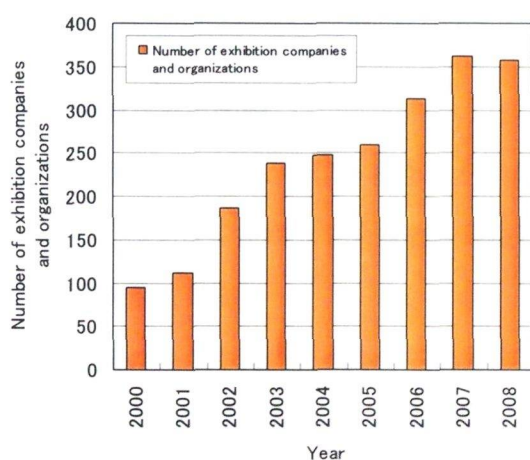
第 1 章 序論

1.1 本研究の背景

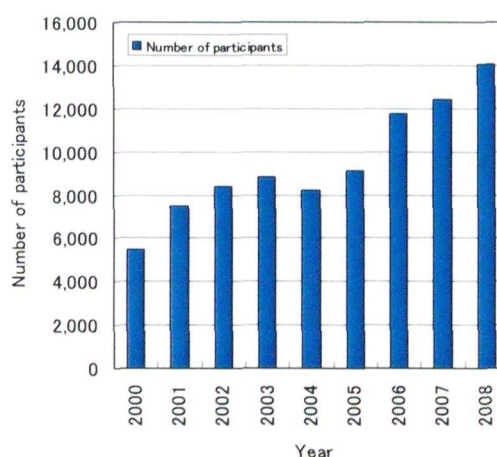
1.1.1 マイクロ加工技術の現状

現在、バイオテクノロジー、IT 関連機器、電子機器、光学機器などの新しい産業において、マイクロテクノロジーあるいはナノテクノロジーが急速に重要となってきた。半導体製造技術や遺伝子操作技術など、肉眼では観察し得ない領域での技術が我々の生活を支えている。そこで、半導体関連産業、IT 関連産業、精密機器製造産業、光学関連産業をはじめとして様々な産業分野において、各種材料を対象にした微細加工技術の開発が盛んに行われている。特に、微細加工技術はMEMS (Micro Electro Mechanical Systems)、マイクロマシン、センサなどのような超精密微細構造デバイスに適用されている。図 1-1 に MEMS / デバイス、マイクロマシン、超精密・微細加工、計測技術などを対象とした展示会であるマイクロマシン/MEMS 展における出展企業団体数と参加者数の年次推移を示した¹⁾。図 1-1 に示すように多くの企業が参入しきており、マイクロテクノロジーに関連する産業の拡大と成長がわかる。これらのデバイスは様々な分野に応用するために研究開発が進められているが、特に、在宅医療の発展、POCT (Point of care testing : 診療・看護などの医療現場での臨床検査) の発展、医療ミスの低減などのために、医療機器への応用が期待されている。しかし、医療機器の微小化の課題として、強度、耐久性、エネルギー供給方法、生体適合性、安全性、信頼性などが考えられる。微細加工技術を利用した医療用部品の作製に関する研究では、カテーテルや無痛針を作製する研究が行われている。例えば、異方性エッチングによるマイクロニードルアレーの作製²⁾、生分解性材料を用いたランセットの作製³⁾、レーザ加工によるフレキシブルなマイクロニードルの作製⁴⁾などが行われている。また、微細加工技術を利用して血管の狭窄部を拡張する時に用いるステントを作製する研究も行われおり、レーザ加工、化学処理または電解研磨によるステントの作製⁵⁾や、レーザ加工を利用した薬物徐放機能をもつカバーステントの作製⁶⁾などがある。マイクロ部品の作製以外にもデバイスや装置開発に関する研究では、カプセル内視鏡に用いるためのマイクロアクチュエータの開発⁷⁾や、目の中に装着して涙液糖を連続測定するバイオセンサの開発⁸⁾や、非侵襲の光ドップラー式マイクロ血流センサの開発⁹⁾などが行われている。

微細加工技術，MEMS，マイクロマシン技術などの発展に伴い，マイクロ流体やナノ流体に対する技術開発が，半導体関連産業，電子機器産業，バイオテクノロジー産業などのような微小領域を扱う分野において必要不可欠となっている．例えば，半導体関連産業や電子機器産業では微細加工技術の発展に伴って IC やメモリなどの電子デバイスを集積化・小型化することによって高性能化が図られてきたが，マイクロプロセッサをはじめとする電子デバイスからの発熱が増加したため，液体をマイクロ流路に流すことによって冷却する方法が検討されている．また，化学関連産業やバイオテクノロジー産業などでは約 20 年前から小型化の研究がはじめられており，例えば，クロマトグラフィーに用いられる中空シリンダーの大きさは，数 cm から数 mm へ，さらに数百 μm へと微小化が進んでおり，今後はさらに分析装置全体の小型化が望まれている．マイクロ流路を利用することによって，高効率化，省資源，省エネルギー，携帯性などの効果が期待できる．さらに，ダウンサイズによる新しい効果として，例えば，反応が早く終わることや，電気的な送液が可能になること，微粒子 1 つ 1 つを取り扱えるなどが考えられる．このようなマイクロ流体を扱う代表的な技術分野に μTAS （Micro Total Analysis System）と呼ばれるマイクロ分析システムがあり，近年注目されている¹⁰⁻¹²．また， μTAS は Lab-on-a-chip と呼ばれ，すなわち「1 つのチップに実験室を実現する」というように，化学やバイオの分野における研究開発手段としての活用も盛んである．これ以外にも，マイクロリアクター，micro fluidic device，bioMEMES とも呼ばれている．



(a) 出展企業・団体数



(b) 展示会参加者数

図 1-1 マイクロマシン/MEMS 展における出展企業団体数と参加者数の年次推移

1.1.2 μ T A Sの特徴と研究動向

A. μ T A Sの特徴

近年、血液検査やDNA分析など多くの分野においてマイクロ流体の成分分析を精度良く、迅速に行いたいという要求が高まっている。そこで、図 1-2 に示すような流体試料の注入、混合、攪拌、分離、抽出を行う機構部品や、流路、溜池、検出、測定などの流体分析に必要な要素を小型・集積化した μ T A Sが注目されている。 μ T A Sにより、試料や試薬の低減、廃液の低減、測定時間の短縮、省電力化、携帯性の向上などが期待されている¹⁰⁻¹²⁾。

μ T A Sを構成するマイクロ流体デバイスには以下のような特徴があげられる¹⁰⁻¹¹⁾。

(1) 集積化

マイクロ化に伴い、分析の並列化、装置全体の小型化などができる。

(2) 液体量の低減

マイクロ化に伴い、分析に必要となる試料・試薬や廃液量などを低減できる。

(3) 効率的で高速な混合

空間が非常に小さいため分子の拡散移動距離が短くなり、混合などの物質移動が高速となり、化学プロセスに要する時間が大幅に短縮できる。

(4) 界面での効率的な反応

試料体積に対して接触する固体の表面積あるいは液体と液体が接触している界面積の割合が大きいため、抽出などの界面を利用した化学プロセスを攪拌などの機械的操作なしで迅速に行える。

(5) 効率的な温度制御

熱容量が小さく、単位体積あたりの表面積が大きいために、熱交換の効率が極めて高く、急速な温度切り替えなどの温度制御が容易に実現できる。

(6) 滞留時間の制御

流路の長さや流速を調節することによって滞留時間を極めて短くすることができる。

不安定活性種の制御などに有効であり、迅速に次の反応に利用することができる。

以上のような特徴をもつ μ T A Sは、基礎科学から新産業創出まで幅広い分野で技術革新をもたらすと期待される。

次に、 μ T A Sの対象分野としては、表 1-1 に示すように多くの分野に応用が可能であると考えられている。医療・創薬分野では、臨床医療の高度化、在宅医療の発展、重大感

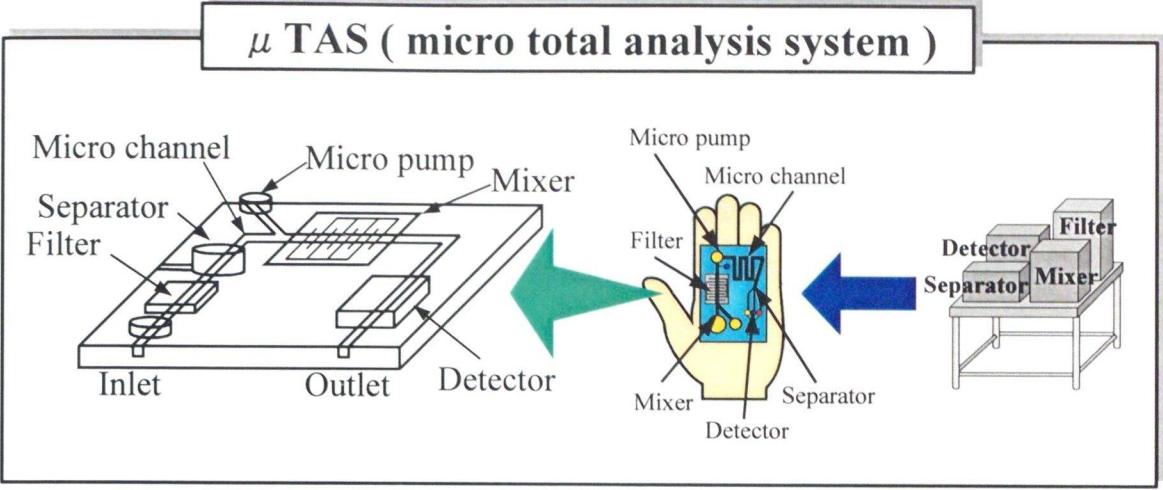


図 1-2 μ T A S (マイクロ分析システム) の概念図

表 1-1 μ T A S の応用分野とその例

| 応 用 分 野 | 応 用 例 |
|----------|---|
| 医療・創薬 | <ul style="list-style-type: none"> ・血液検査 ・ヘルスケア ・POCT ・遺伝子解析・DNA分析 ・新薬開発 ・薬物体内動態 ・ゲノム／プロテオーム |
| 化学 | <ul style="list-style-type: none"> ・化学プラント ・化学プロセスのモニタリング ・有機合成（コンビナトリアルケミストリー） |
| バイオ・食品 | <ul style="list-style-type: none"> ・細胞培養 ・細胞溶解 ・タンパク質結晶化 ・細胞配置 ・微生物実験 ・食品検査・管理 ・発酵・醸造 |
| 環境分野 | <ul style="list-style-type: none"> ・大気モニタリング ・土壌モニタリング ・水質モニタリング ・有害物質の分析 ・漏洩検査センシングシステム |
| エレクトロニクス | <ul style="list-style-type: none"> ・燃料電池 ・小型(可搬型)エネルギー技術 ・電子デバイス(冷却など) ・マイクロマシン ・極限環境の探査（宇宙，深海、火山等） |

感染症予防，新薬の開発などに対する応用が期待される．化学・バイオ・食品分野では，化学物質の生成，細胞や微生物の操作，食品開発，品質管理などに対する応用が期待される．環境分野では，環境破壊に対するモニタリングとしての応用が期待される．エレクトロニクスでは，エネルギー機器，電子デバイスなどへの応用が期待される．特に，DNAチップや血液検査などのような医療・生物化学の分野は最も実用化が期待されている分野である．しかし， μ TASを実現するためには技術的な課題も多く，現在までに実用化されている例は少ない．

B. μ TASの研究動向

これまでにエレクトロニクスの発展とともに，シリコンに集積回路を作製する微細加工技術も発展してきた．この加工技術は1970年代後半にはマイクロマシン技術にも応用されるようになった．そして，マイクロ流体へ応用され，例えば1979年に報告されたスタンフォード大学のガスクロマトグラフの例がある¹³⁾．シリコン基板に，試料注入バルブ，分離カラム及び熱伝導検出器を一体化したものである．この技術は小型のガスボンベとともにシステム化され，可搬型のガスクロマトグラフとして製品化された．さらに，1989年にはManzらがInternational Conference on Solid-State Sensors and Actuators (Transducers '89)で μ TASという概念を提唱し，1990年に同グループにより液体クロマトグラフの分離カラムと電気伝導度検出器を集積化したチップが報告された¹⁴⁾．1997年にも同グループにより電気浸透性流れによって小型化された総合的化学分析システム(μ TAS)の作製が報告された¹⁵⁾．その後，マイクロマシン技術の応用分野として， μ TASの研究が多く取り組まれるようになった．

μ TASをはじめとする化学反応を行うためのマイクロデバイスはマイクロリアクタとも呼ばれている¹¹⁾．1994年に μ TASの国際会議がオランダのEnschedeにあるTwente大学で開催された．1997年にドイツ連邦科学技術省(BMBF)が助成プログラム「化学プロセス用マイクロリアクタシステム」を発表し，イギリスでは1999年に分析および合成用マイクロリアクタシステムを実現する技術開発のためのコンソーシアムをつくり，アメリカではMIT大学やHarvard大学など多くの大学や研究機関によってマイクロ化学の研究が活発に進められている．日本では，1993年に生田らによって，理化学装置や医療分析分野に適用するマイクロ集積化流体システムの提案と試作試験結果が報告され¹⁶⁾，1997年には大堀らにより医療用 μ TASを目的とした血流制御のための3方マイクロ弁の開発が報告

された¹⁷⁾。さらに近年、この分野に対する関心が急速に高まっており、東京大学、(財)神奈川科学技術アカデミー、日立製作所をはじめとする多くの研究機関や組織において研究開発が活発になっている。現在では、表 1-2 に示すように多くの企業や研究機関が μ T A S の分野へ参入してきている。そして、2002 年に μ T A S の第 6 回国際会議 (μ T A S 2002) が奈良県で開催され¹⁸⁾、その後 2006 年に東京で μ T A S 2006 が開催された。

独立行政法人科学技術振興機構(JST)の科学技術文献情報データベース検索(JDream II)を用いて μ T A S, Lab-on-a-chip, micro fluidic device, マイクロ流体デバイス, マイクロ流体チップ等をキーワードとして、論文および短報の年別発表件数(発行国を限定しない場合と日本に限定した場合)を調べた結果を図 1-3 に示す。1999 年以降に件数が急速に伸びており、 μ T A S に関する研究開発が急速に進んでいることがわかる。また、上記の μ T A S 国際会議における発表申し込み数は、図 1-4 に示すように年々増加しており¹⁹⁾、これは図 1-3 の論文発表件数の推移と同様な傾向を示している。また、図 1-5 に東京で開催された μ T A S 2006 において採択された論文について、トピックス別に論文数の分布を示した¹⁹⁾。約半分がマイクロ加工、MEMS、マイクロ流体、検出システムなどの物理や機械や電気系の論文で、もう半分が化学やバイオ系の論文であり、これまでに μ T A S の製造技術に関する研究と、 μ T A S の応用分野に関する研究が同時に取り組まれてきたことがわかる。 μ T A S は MEMS の研究開発と化学・バイオ系の研究開発が協力しなければ進展しない分野であり、両者のバランスの取れた研究が重要である。本論文で述べている技術分野は、図 1-5 中の「マイクロ加工」、「マイクロ流体」、「マイクロ流体デバイス」、「検出・計測」、「医療」のトピックスに相当しており、半数近くの部分に関連がある。

表 1-2 μ T A S の関連機関

| デバイスの種類 | 主な関連機関 |
|-------------------------|--|
| μ T A S, 各種のバイオデバイス | 東京大学, 早稲田大学, 京都大学, 名古屋大学, 東京工業大学, 筑波大学, 東北大学, (財)神奈川科学技術アカデミー, (独)産業技術総合研究所, 東芝, 日立製作所, オリンパス, Agilent Technologies, Caliper Technologies, 堀場製作所, 島津製作所, 松下電器産業, Infineon Technologies, オムロン, 日立ハイテクノロジーズ, 日立化成工業 など |
| DNA チップ | 東京大学, 大阪大学, 東京農工大学, 北陸先端科学技術大学院大学, Affymetrix, Agilent Technologies, タカラバイオ, Naongen, オリンパス, 日清紡, 三菱レイヨン, 日立ソフトウェアエンジニアリング, 東芝 など |

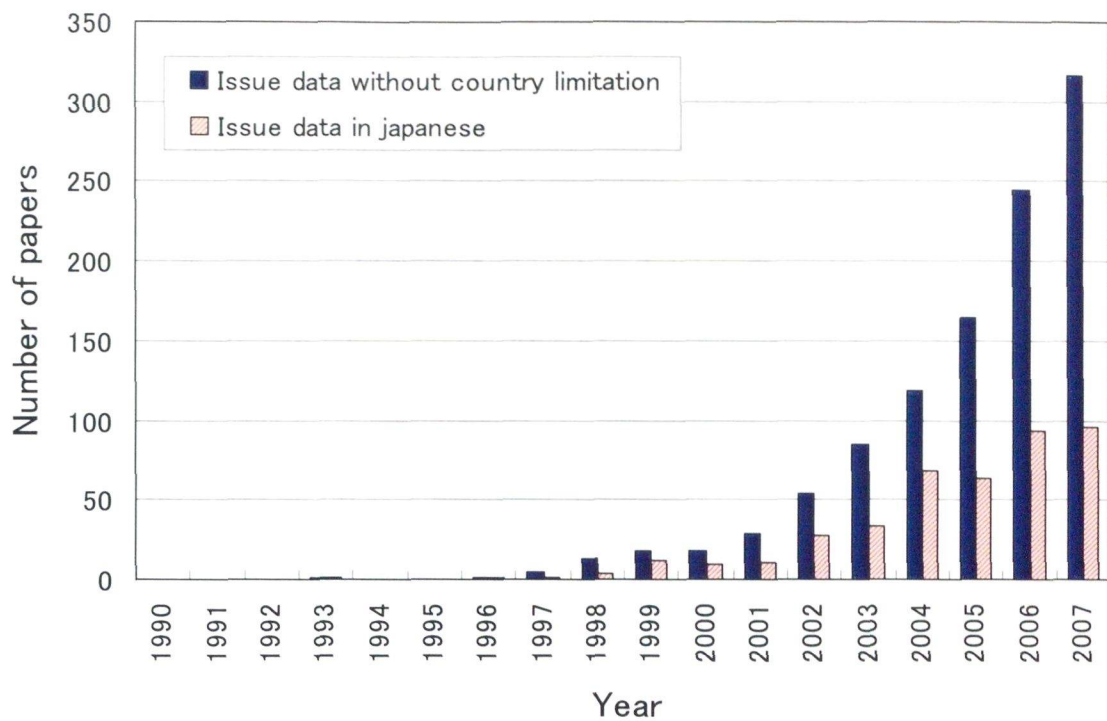


図 1-3 μ T A Sに関する研究の論文件数の年次推移

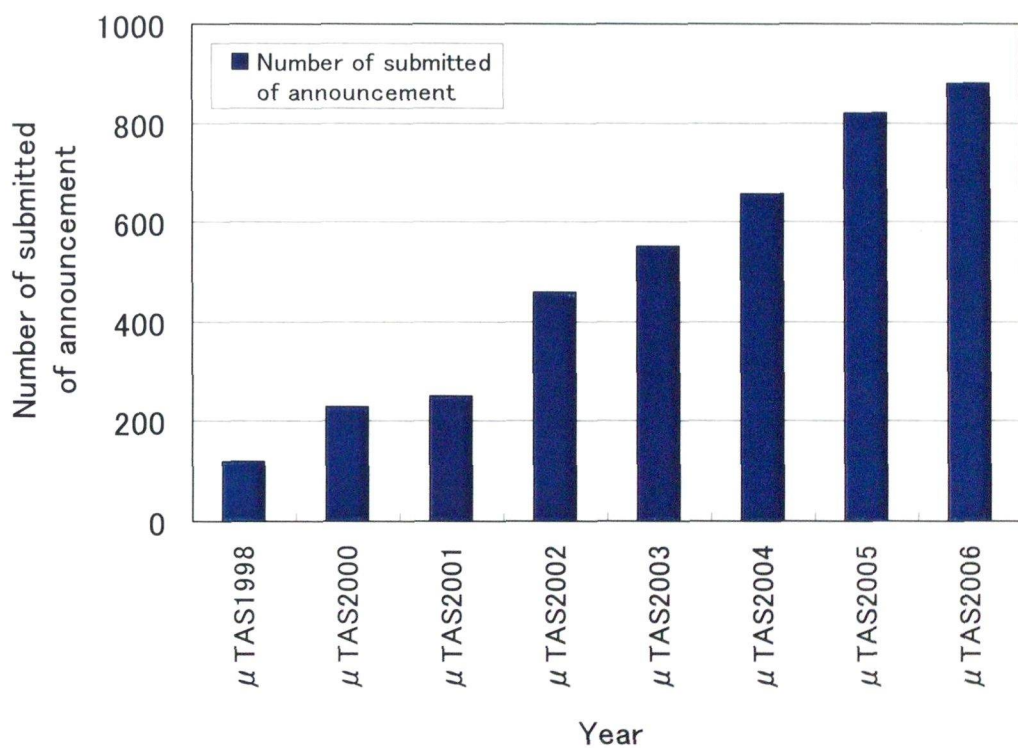


図 1-4 μ T A S国際会議における発表申し込み数の年次推移

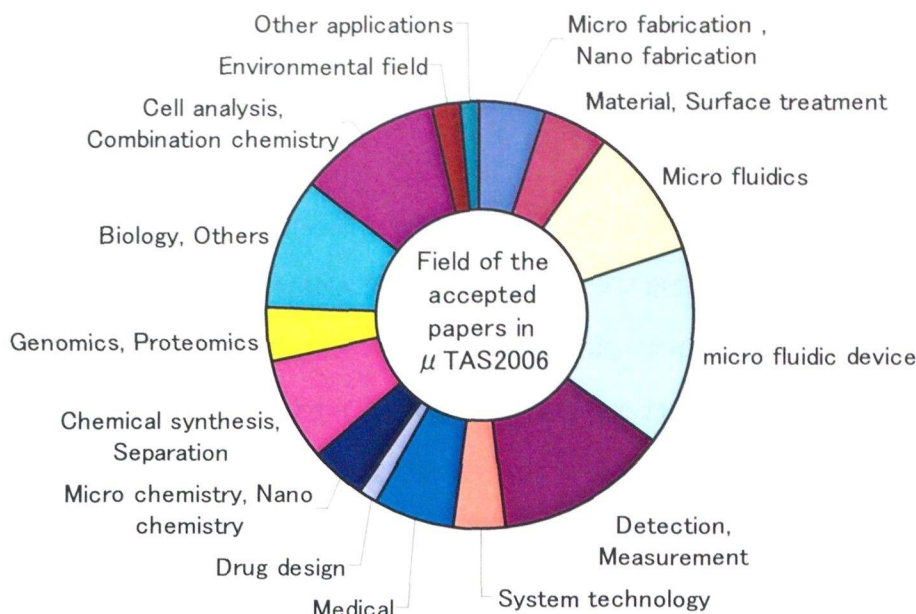


図 1-5 μ T A S 2006 における採択論文のトピックス別論文数

C. μ T A S の現状

μ T A S の基本ユニットであるマイクロ流体チップに関しては、実用化された例がいくつかある。例えば、(株)日立ハイテクノロジーズがマイクロ流体チップの受託作製サービスを行っている。チップの素材にはシリコンポリマー (PDMS : polydimethylsiloxane) を用い、フォトリソグラフィーで型を作製し、モールドイングで PDMS に微細溝を作製し、その後、基板と貼り合わせるとチップになる。また、東ソー・クォーツ(株)ではウェットエッチングや機械加工によって作製した石英ガラスのマイクロチップを製造販売している。

近年、このようなマイクロ流体チップを活用した μ T A S に関する研究開発が行われている。亀井らは、ポータブル高速バイオ分析装置を目的として、励起光源と一体化可能な集積型蛍光検出センサを提案・実証し²⁰⁾、さらに半導体微細加工技術を用いてアモルファスシリコン・フォトダイオード上に光学干渉フィルターを集積化することによって高速高感度検出の DNA 分析装置を開発した²¹⁾。Robillot らは、強磁性駆動と電氣的検出によってタンパク質や病原菌の定量化が可能なマイクロ流体デバイスと本体装置を開発した²²⁾。東京大学の北森らは、マイクロ流路の作製方法²³⁾、マイクロ化学プロセスの検討²⁴⁾、熱レンズ顕微鏡の装置開発²⁵⁾、神経細胞イメージングの検討²⁶⁾、熱レンズ顕微鏡を測定手段として免疫分析や細胞生化学分析など各種分析への応用についての検討²⁷⁾を行っている。

る。さらに、マイクロ化学技研(株)を設立し、研究開発成果である化学プロセスの集積化技術とツール（集積化化学実験室 I C L : INTEGRATED CHEMISTORY LAB）を研究者に供給しており²⁸⁾、これらは μ T A S の応用分野の研究開発におけるツールとして活用できる。

さらに、現在では μ T A S を応用し実用化された分析機器がいくつかある。(株)島津製作所では2007年8月に「DNA/RNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置」を μ T A S を応用したラボツールとして実用化している²⁹⁾。この装置は、ライフサイエンス研究におけるDNA やRNA の核酸サンプルのサイズ(大きさ)の確認やおおまかな定量を、迅速かつ簡単に行えるマイクロチップ電気泳動装置である。マイクロチップを用いた高速な電気泳動分離を、蛍光検出により高感度に、しかも全自動で分析する装置である。しかし、石英製のマイクロチップが比較的高価であり、分析コストが高い。そこで、マイクロチップは分析前および終了時に自動的に洗浄を行い、標準サンプルと標準条件で分析した場合に3,600回の再利用を可能にした。その結果、1サンプルあたりDNA 分析で約25円、RNA 分析で約35円のコストとなった。ただし、本体価格は398万円であり³⁰⁾、本体寸法はW415mm×D545mm×H508mm、重さは43kgある。このように、チップに比べて流体駆動部や検出部などを含めた周辺機器が、比較的大きく高価である場合が多い。また(株)三ツワフロンテックでは、反射率測定干渉分光法の原理とマイクロ流体チップを組み合わせたバイオセンサアレイシステムを μ T A S を応用したラボツールとして提供している。この装置は生体分子間相互作用の速度定数を解析できる装置であり、光学薄膜とマイクロ流体チップを組み合わせることによって自由度や拡張性の高い研究開発向けおよびライン用のシステムとして用いることができる³¹⁾。

1.1.3 μ T A S の作製方法および課題

A. μ T A S の作製方法

マイクロ流体デバイスの主な加工方法³²⁻³⁴⁾としては、エッチングをはじめとする半導体プロセスを応用した手法^{23, 35, 36)}、LIGA プロセス (Lithographie Galvanoformung Abformung)をはじめとするMEMS 技術による手法^{37, 38)}、切削加工をはじめとする機械加工による手法^{39, 40)}、ナノインプリントをはじめとする転写加工やプラスチックモールディングなどによる手法⁴¹⁻⁴³⁾、微細放電加工による手法、レーザ加工による手法^{44, 45)}などがある。マイクロ流体デバイスを作製する上で、これらの加工方法にはそれぞれ特徴がある。半導体プロ

セスを応用した手法では、超微細な加工や高精度な加工が可能である。しかし、限定された材料しか適用できず 2.5 次元の加工に限られてしまい、また工程も複雑でコストが高くなってしまう課題がある。MEMS 技術による手法では、マイクロ機構部品などを作製可能である。しかし、工程が複雑でコストが高くなってしまう課題がある。機械加工による手法では、曲面などの 3 次元形状の加工が可能であり形状の変更も容易である。しかし、数 μm の形状の加工は困難であり、大量生産に不向きであり、またバリが発生してしまう課題もある。転写加工やプラスチックモールドニングなどによる手法では、比較的高精度な加工が可能であり、コストも安く大量生産が可能である。しかし、高精度な型が必要であるとともに形状変更が困難であり、また限定された材料しか適用できず 2.5 次元の加工に限られてしまう課題もある。微細放電加工による手法では、金属への微細形状が加工でき、また転写加工や射出成形に用いる高精度な型を作製することが可能である。しかし、導電性材料に限られ、加工時間が長くコストが高くなってしまう課題がある。レーザ加工による手法では、数 μm までの形状の加工が実現でき、ドライ加工で比較的高速な加工でもあり、形状の変更も容易である。しかし、形状精度の確保やデブリが発生してしまうため洗浄・除去する場合があるという課題もある。このようにマイクロ流路を作製する上で、これらの加工方法には加工寸法、形状精度、加工表面粗さ、加工速度、製造コストなどにおいてそれぞれ利点と欠点があり、多くの大学や研究機関で研究開発が行われている。本研究では、多品種少量生産が必要となるような場合におけるマイクロ流体デバイスの製造や μTAS の研究開発用マイクロ流体デバイスの製造などにおいて、多種多様な流路形状に対応するためにはレーザ加工が最適であると考えた。

また、マイクロ流体デバイスの作製方法として、吉田らは樹脂ラミネート法と呼ばれるマイクロ流路作製法を開発した⁴⁶⁾。樹脂ラミネート法によるマイクロ流体デバイスの作製方法を図 1-6 に示す。この作製方法は、マイクロ機構部品や電極を予め組み込んだ基板の上に、樹脂フィルムをラミネート接着することによって樹脂部分を形成し、この樹脂部に流路や反応溜池などを作製する方法である。これにより、使用済み μTAS は汚染された流路等のある樹脂部分のみを洗浄・除去し、各種部品が組み込まれた基板部は再利用ができるため低価格化、洗浄・交換の簡素化、衛生的であるなどの効果が期待できる⁴⁷⁾。そこで本研究では、マイクロ流体デバイスの作製方法としてレーザ加工とこの樹脂ラミネート法を用い、マイクロ流路作製技術の最適化について検討を行った。

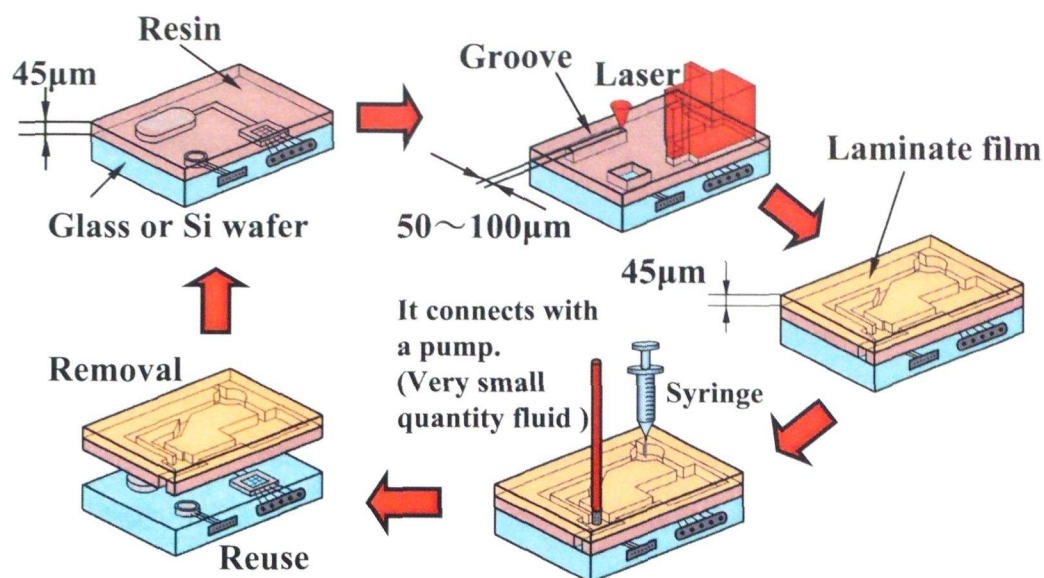


図 1-6 樹脂ラミネート法によるマイクロ流体デバイスの作製

B. μ T A S の課題

μ T A S の研究はマイクロ空間を共通要素としているので、微細加工技術などのマイクロ空間を作製するための技術（製造者）やマイクロ流体を制御するための技術（製造者）と、応用技術（ユーザー）が融合することでシステムが完成するという特徴がある。 μ T A S にかかわる研究者は、機械、電気、情報、化学、バイオ、医薬、エネルギーなどの多岐にわたっている。したがって、 μ T A S の実用化を促進するためには、異分野の研究者が情報交換することが必要である。このうち、マイクロ流路の作製技術やマイクロ流体の制御技術など、マイクロ流体デバイスの技術開発における課題や研究開発の具体的な内容としては、以下のような項目があげられる。

(1) 微細加工技術

高精度な微細形状の加工，バリやデブリのない加工面，高品位な加工表面粗さの実現が必要である。

(2) 微小流路作製方法

流路となる溝が加工された基板に天板の部品を貼り合わせる時に，試料の漏れや流路の変形が発生しない接着方法の確立が必要である。

(3) 材料の選定や開発

加工性，耐薬品性，生体適合性，光透過性など検出のために必要な特性などを備えた材料の選定，あるいは材料開発が必要である。

(4) 流体駆動方法

微量な試料でも駆動可能な方法や、微量な流体であるため高精度な流量の制御が必要である。同時に、省力化や小型化が求められる。

(5) 混合方法

マイクロ空間における流体の混合や、さらに層流となる場合における流体の混合が可能な方法が必要である。

(6) 試料の注入注出部

チップとポンプやチューブとの接続において試料の漏れや流れに影響の少ない注入部が必要である。廃液の処理が容易で廃液の流出のない抽出部が必要である。

(7) 分離・抽出方法

微量な流体であるため分解能が高い分離および抽出方法が必要である。同時に、省力化や小型化が求められる。

(8) 検出システム

微量な流体であるため定量性と検出感度が十分な検出システムの開発が必要である。同時に、小型化が求められる。

(9) コスト

チップや本体などの周辺装置の低価格化が求められる。

(10) システム全体の小型化

このように、 μ T A S を実現するためにはマイクロ流体デバイスにおける技術的な課題が多く、さらに応用分野の課題もあるため、現在までに実用化されている例は少ない。

1.1.4 血液検査への μ T A S の応用と発展

現在、いくつかの研究グループが細胞分析や血液検査のための μ T A S を研究開発している。Sethu らは、ほぼ単細胞水準で赤血球除去を行うことによって、赤血球の完全溶解と白血球の 100%回収を行うマイクロ流体デバイスを開発した⁴⁸⁾。物質・材料研究機構の堀池らは、血管位置のモニタリングと無痛針による採血アセンブリ、さらに高脂血症や肝機能診断が可能な 3 項目測定用比色法マイクロ流体デバイスを開発した⁴⁹⁾。Cheng らは、CD4+ T CELL を計数して H I V を診断するマイクロ流体デバイスを開発した⁵⁰⁾。Shevkoplyas らは、マイクロ流路の深さを白血球の大きさと同じ寸法にすることによって全

血から白血球を濃縮するマイクロ流体デバイスを作製した⁵¹⁾。L. Li らは、長くて狭い複数の親水性サイドチャネルをもつマイクロ流体デバイスを作製し、このデバイスをトロンビンの酵素活性評価とヒト血漿の凝固時間測定に応用した⁵²⁾。Price らは、微細孔管やマイクロ流路内で機械的に変形された赤血球からのアデノシントリホスフェート(ATP)を測定するマイクロ流体デバイスを作製した⁵³⁾。Kim らは、ヒト慢性白血病細胞を用いてマイクロ流体デバイス上で細胞のエレクトロポレーション（電気穿孔法、形質転換法）を行う方法を提案した⁵⁴⁾。産業技術総合研究所の片岡や徳島大学の前田らは、電気泳動を用いて血糖値をモニタするマイクロ流体デバイスを作製した^{55, 56)}。Lee らは、双曲線集中形状マイクロ流路とせん断流を用いて赤血球変形を観察するマイクロ流体デバイスを作製した⁵⁷⁾。Blattert らは、主流路から分離する複数の細い平行マイクロ流路によって血漿を分離するマイクロ流体デバイスを作製した⁵⁸⁾。東京大学の山田らは、マイクロ流路と流体力学的分離方法を提案し、血球分離と濃縮を行うマイクロ流体デバイスを作製した⁵⁹⁾。

現在までに μ T A S を血液検査へ応用し実用化された製品がいくつかある。米国アイスタットコーポレーションでは、 μ T A S を応用した血液分析装置としてポータブル血液分析器「i-STAT」を実用化している⁶⁰⁾。この装置は、従来の血液分析装置に比べて非常に小型で携帯性に優れており、かつ大型機器と同程度の機能を有しており、臨床現場で必要に応じた使用ができる利点がある。ローム(株)とウシオ電機(株)と(株)三和化学研究所の3社は2008年10月に μ T A S 測定チップを使用した微量血液検査システム「バナリストエース」を実用化した⁶¹⁾。この装置は、測定チップを交換することで、炎症マーカーであるCRP（通常濃度用と低濃度用）の2種類と糖尿病の血糖管理マーカーであるヘモグロビンA1cを測定することができる。半導体メーカーのロームと、光源・光学装置メーカーのウシオ、医薬品メーカーの三和化学の3社がそれぞれの技術とノウハウを結集することによって実用化された。 μ T A S は微細加工技術や計測技術などのMEMSに関する研究開発と医療、化学、バイオなどの応用分野の研究開発が融合する必要がある、これは3社の協力によって研究開発が進展しシステムが完成した例である。

細胞，バクテリア，微粒子の同定やカウントなどの定量測定を行うフローサイトメーターと呼ばれる機器がある．そして，細胞分析や血液検査を目的とする μ TASの将来的な発展分野としてフローサイトメーターが考えられる．フローサイトメーターの構成を図1-7に示す．フローサイトメーターは，細胞に蛍光染色を施し，カウントや細胞の性状に関する測定など様々な分析や細胞分取が可能である．しかし，図1-8に示すように，従来のフローサイトメーターは大型で高価な機器であるため，シスメックス株式会社や日本光電工業株式会社などによって卓上タイプの小型フローサイトメーターが開発され，自宅やケアハウスなどで気軽に検査ができる超小型のフローサイトメーターが開発されつつあり，さらにマイクロフローサイトメーターの開発が望まれている．

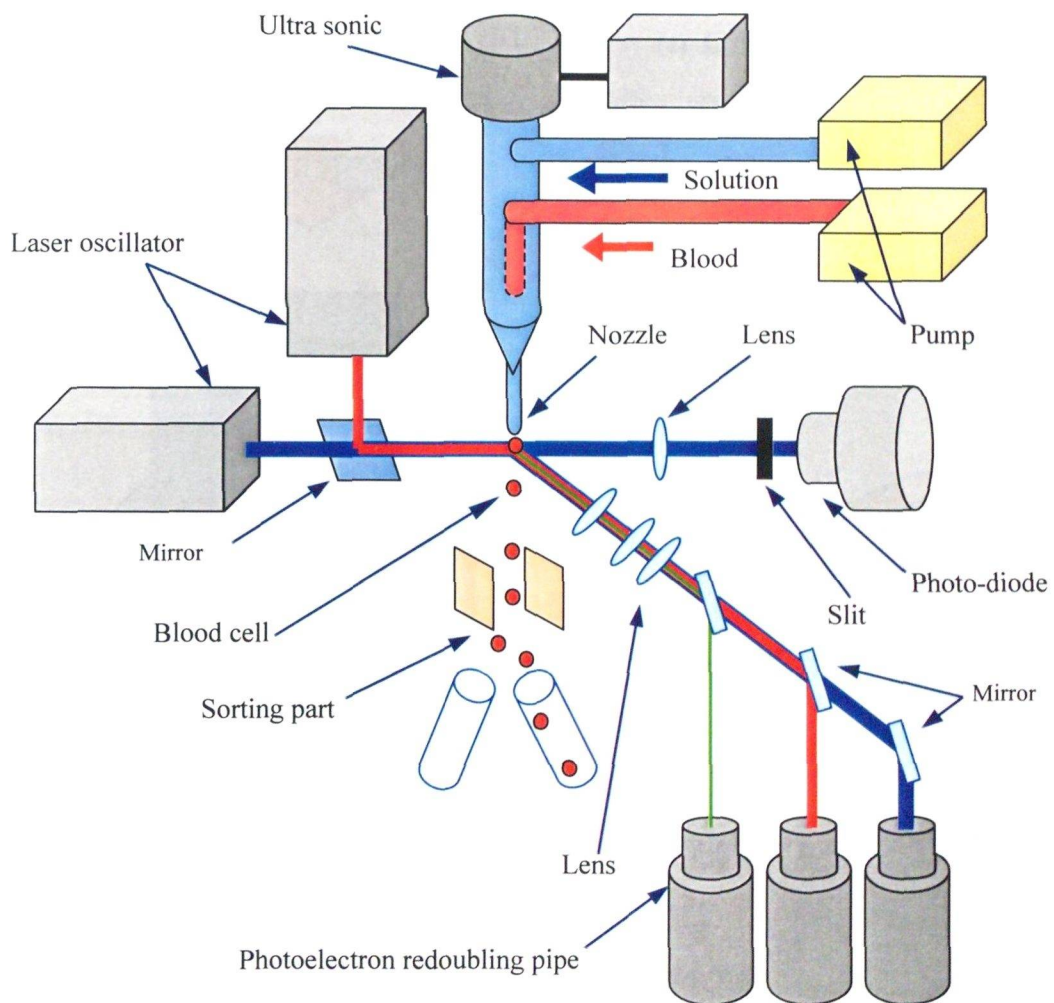
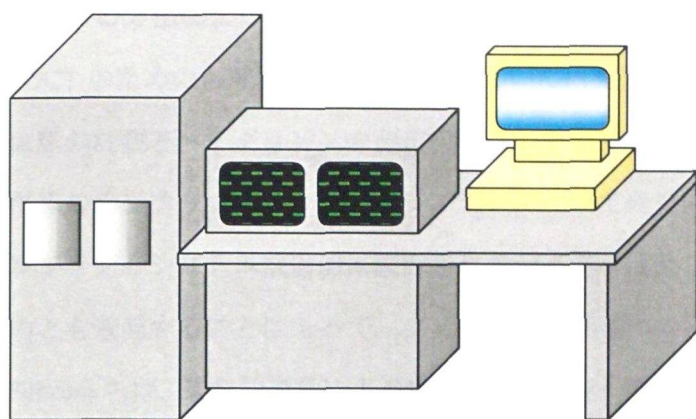
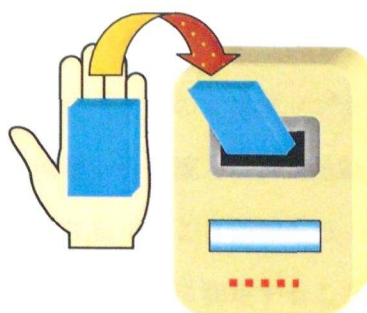


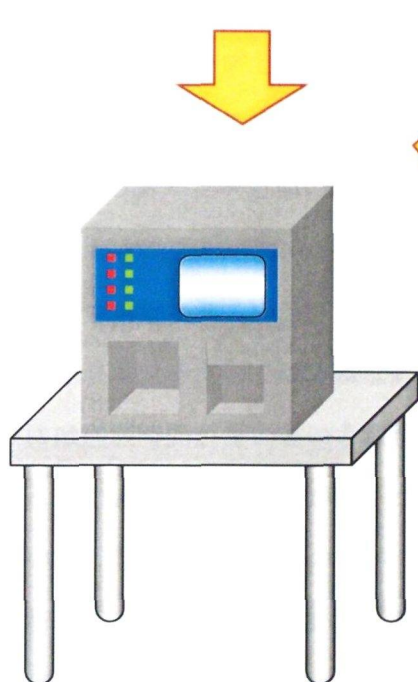
図 1-7 フローサイトメーターの構成



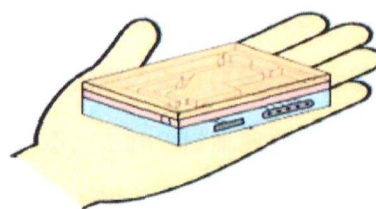
(a) フローサイトメーター



(c) 超小型フローサイトメーター



(b) 小型フローサイトメーター



(d) マイクロフローサイトメーター

図 1-8 フローサイトメーターの小型化

現在、いくつかの研究グループがフローサイトメーター、セルソーター、セルカウンターなどを目的とした μ TASを研究開発している。Sun らは、蛍光細胞を高精度に選別するための電気泳動で駆動するマイクロ流体システムを報告している⁶²⁾。それらは、複製を成型する方法によってポリマーにマイクロ流体デバイスを作製している。Larsen らは、POCTのための血球計数用 μ TASについて研究開発を行った⁶³⁾。この装置は血小板や白血球の計数とヘモグロビンの測定を行うことができる。一木らは、一つの細胞を分析するためのオンチップセルソーターシステムについて研究開発を行った⁶⁴⁾。このオンチップセルソーターシステムは適切に設計されたマイクロ流路における積層シース流と反誘電泳動力とを兼備することによって、ダメージなしで一つの細胞を選別収集することができる。Schrum らは、電氣的運動による集中を用い、レーザ光の散乱と蛍光を同時に測定することにより、蛍光着色したラテックス微粒子と着色していない微粒子を検出・計数するマイクロチップサイトメーターを開発した⁶⁵⁾。田邊らは、POCTのための集積化MEMS血球分析装置について研究開発を行った⁶⁶⁾。この装置は血球計数センサ、ヘモグロビン濃度センサ、試料秤量センサを同一チップ上に集積化して小型化している。また、Rieseberg らは、バイオテクノロジーの多くの分野において個々の細胞を分析するフローサイトメーターの重要性と、フローサイトメーターと他の分析技術との融合の必要性を述べている⁶⁷⁾。このように、フローサイトメーター、セルソーター、セルカウンターなどを目的とした μ TASの研究開発がいくつか行われている。しかし、定量測定を必要とするような場合、フローサイトメーターやセルソーターでは多量の試料の処理が可能であるが、 μ TASでは多量の試料を扱うには送液時間が長いという課題がある。また、上述のように細胞や血球を並べて測定を行う μ TASの研究開発がいくつか行われている。これらは血球を並べて流すことができている。しかし、これらのデバイスでは液体試料を流す方法は十分に確立されておらず、分析チップは非常に小さいが、対照的にポンプや接続チューブのように周辺装置は非常に大型であるという課題もある。一方、 μ TASでは1つ1つの細胞や血球について検出や分析を行うことができるという特徴も考えられるが、これらのデバイスでは1つ1つの細胞や血球について精度良く検出や分析を行う方法は十分に確立されておらず、さらに、検出機器が分析チップ外部の装置を使用している場合も多いため、分析チップは非常に小さいが対照的に検出機器は非常に大型であるという課題もある。

1.2 本研究の目的と意義

マイクロ流体デバイスの作製手法としては 1.1.3 節で述べたように多くの加工方法の適用が検討されているが、多品種少量生産が必要となるような場合におけるマイクロ流体デバイスの製造や μ T A S の研究開発用マイクロ流体デバイスの製造などにおいて、多種多様な流路形状に対応するためにはレーザ加工が最適であると考えられる。そこで本研究では、樹脂材料に対し非熱でアブレーション加工が可能な紫外線レーザ(UVレーザ)に着目し、レーザ加工を用いたマイクロ流体デバイスの作製について検討を行った。本研究の目的は、東洋大学で開発されたレーザアブレーションと樹脂ラミネート法を組み合わせたマイクロ流路作製技術の最適化による3次元立体流路加工技術を検討することと、血液検査用マイクロ流体デバイスへの応用の可能性を検討することである。

血液検査には主に、血球計測、変形能測定、形成時間測定、凝固時間測定などがある。本研究では血球計測のうちの血球計数と、血球変形能の観察のためのマイクロ流体デバイスの作製を目的とした。血球計数は血液中の血球数を把握することであり、赤血球数が多い場合は多血症、血液濃縮(脱水など)が考えられ、少ない場合は貧血や出血等が考えられ、このような疾患や白血病などの診断に不可欠である。また、変形能測定は赤血球の物理的・化学的性状変化を把握することであり、糖尿病、心筋梗塞、脳血管障害の予防や治療に不可欠である。血液中の脂肪分や糖分が増加し、赤血球が付着してかたまりとなり、さらに変形能が低下することによって、心筋梗塞や脳梗塞のような生活習慣病の原因となるため、変形能測定は重要である。図 1-9 に赤血球の大きさを、図 1-10 に血管内を流れる赤血球の変形能のイメージ図をそれぞれ示す。

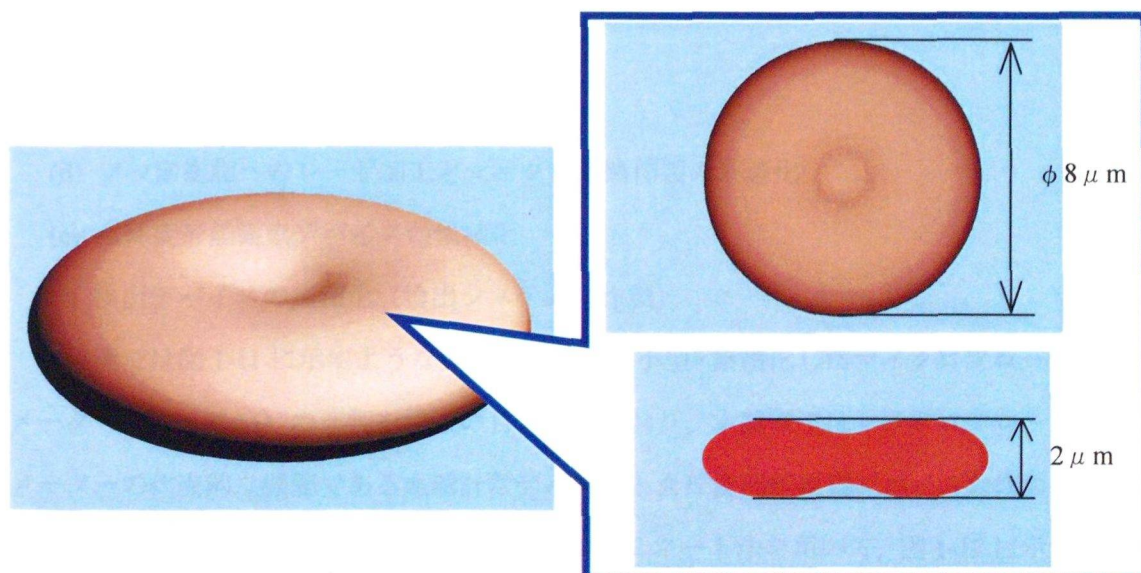


図 1-9 赤血球のイメージとサイズ

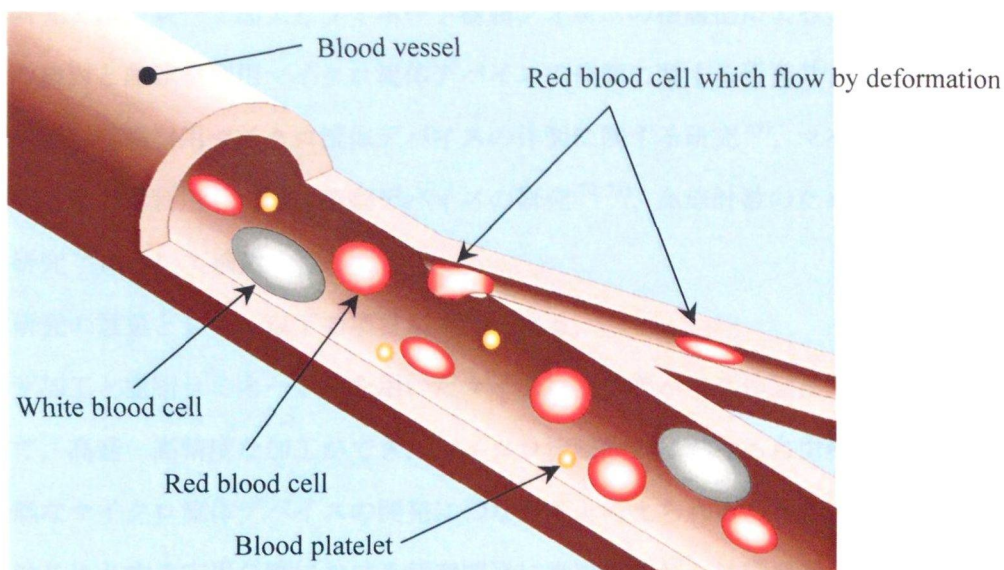


図 1-10 赤血球変形能のイメージ

次に、具体的な課題としては、以下の項目が考えられる。

- ① レーザによる微細 3 次元加工技術の検討
- ② 血液検査に適する材料の探索とマイクロ流路作製技術の最適化
- ③ 血球計数用マイクロ流体デバイスへの応用
- ④ 血球変形能観察用マイクロ流体デバイスへの応用

これらの課題を解決するための手法として、以下の項目が考えられる。

- (a) UV レーザ加工とラミネート樹脂の積層化による 3 次元流路加工技術の最適化
- (b) 血球整列用デバイスの集積化
- (c) 流体駆動デバイスの集積化
- (d) フッ素樹脂へのレーザ加工とマイクロ流路作製の最適化
- (e) 血球変形能観察デバイスの集積化
- (f) 検出デバイスの集積化（検出システムの作製）

本研究では図 1-11 に示すようなカードサイズに小型・集積化したマイクロフローサイトメーター（ μ FCM）の作製を将来の目標としており、本論文ではマイクロフローサイトメーターの代表的な機能である血球計数デバイスと血球変形能観察デバイスの作製と集積化を目的とした。具体的にはレーザ加工と樹脂ラミネート法を用いて、図 1-12 に示すような血液検査用マイクロ流体デバイスの作製を行う。

そこで本研究では、レーザ加工とラミネート樹脂フィルムの積層化による3次元立体流路加工技術の検討と血球整列用マイクロ流体デバイスの作製に関する研究⁶⁸⁾、フッ素樹脂を用いた血球変形能観察用マイクロ流体デバイスの作製に関する研究⁶⁹⁾、マイクロ流路内の液体に加わる重力を利用した流体駆動デバイスの研究^{70,71)}、血球計数のための血球検出デバイスの研究⁷²⁾について検討を行った。

また、本研究の意義として、以下の項目が考えられる。

I. レーザ加工と樹脂ラミネート法を用いたマイクロ流体デバイス作製技術の最適化によって、高速・高精度な加工ができ、マイクロ流路設計における自由度が向上し、高機能なマイクロ流体デバイスの開発につながると考えられる。また、化学やバイオをはじめとする応用分野における研究開発に役立てられ、技術発展に貢献できると考えられる。

II. 重力を利用した流体駆動方法やマイクロ空間を利用した血球検出方法の開発によって、超小型・省電力・高精度なマイクロ流体デバイスが実現し、手のひらサイズで携帯可能な μ TASが可能になると考えられる。

III. POCTのための血液検査用マイクロ流体デバイスを開発することによって、自宅やケアハウスにおける日常のヘルスケアの発展に貢献できると考えられる。特に、血球計数や血球変形能測定を可能にすることによって、循環器系の病気に対する治療や予防に役立てられると考えられる。

IV. マイクロ流路、流体駆動部、検出部などに加え情報通信機能を μ TASに集積化することによって、携帯型ユビキタス医療診断システムとしての発展も期待できる。

以上のような本研究の取り組みや成果は、 μ TASの研究開発および実用化を促進する技術として寄与できると考えられる。

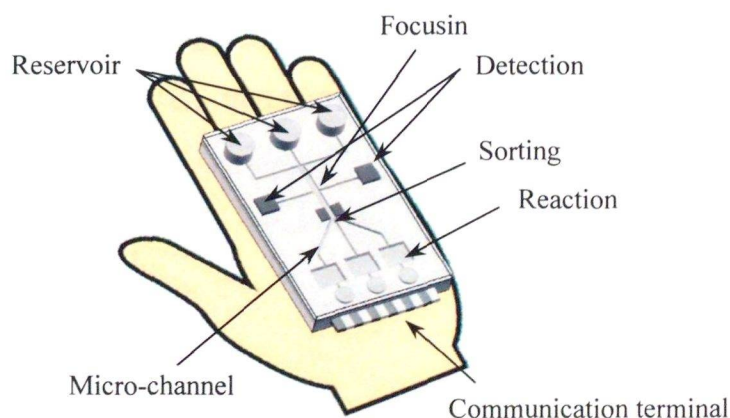


図 1-11 マイクロフローサイトメーターのイメージ図

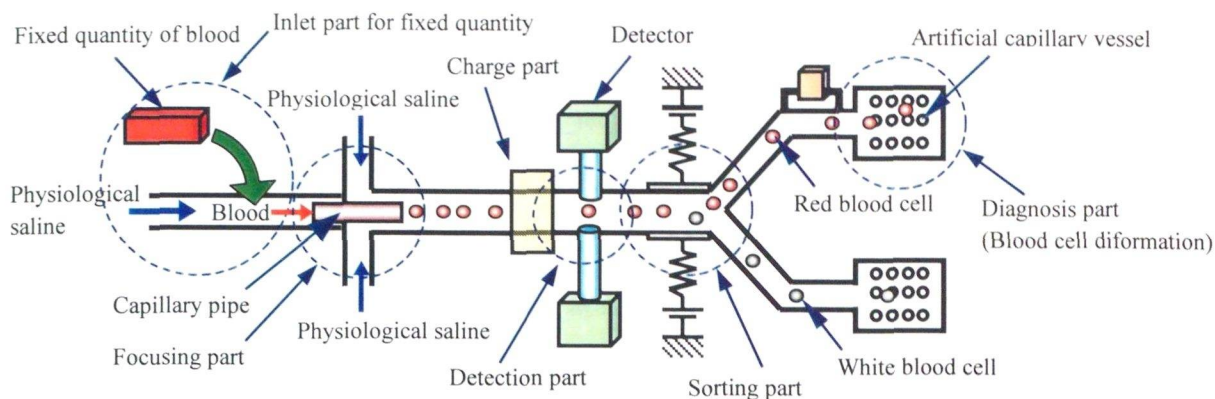


図 1-12 血液検査用 μ TAS の構想図

1.3 本論文の構成と概要

第1章では、マイクロ加工技術や μ TASの研究開発動向、 μ TASの特徴や課題について述べ、さらに血液検査のための μ TASにおける現状と課題について述べるとともに、 μ TASの研究開発における本研究の背景、目的および意義を述べる。第2章では、レーザーによるマイクロ加工技術の検討について述べ、さらにレーザー加工と樹脂ラミネート法を用いたマイクロ流路作製技術の最適化について述べる。第3章では、三又構造マイクロ流路や小径パイプを挿入したマイクロ流路を用いた血球整列に関する検討、フッ素樹脂を用いた血球変形能観察用マイクロ流路における血球変形能に関する検討、重力を利用した流体駆動による血球整列と血球変形能観察に関する検討を行い、血液検査用マイクロ流体デバイスの作製と血液送液について述べる。第4章では赤血球を検出するための小径ファイバを挿入した血球計数デバイスの作製について述べ、さらにこのデバイスとレーザーを用いた赤血球の検出結果について述べる。第5章では本研究で得られた結論を述べる。

参考文献

- 1) (財)マイクロマシンセンター ホームページ：
http://mmc.la.coocan.jp/business/tenji/19th_tenji/19th_tenji.html
- 2) S. P. Davis, W. Martanto, M. G. Allen and M. R. Prausnitz: IEEE Trans Biomed Eng, **52** (5), 909 (2005)
- 3) 青柳誠司, 泉隼人, 青木俊朗, 福田光男: 電気加工学会論文誌, **127** (2), 53 (2007)
- 4) 山岸光, 若林優治, 新井亮一, 吉田善一, 松井泰広, 望月英治: レーザ協会誌, **31** (2), 27 (2006)
- 5) 窪田真一郎, 横溝精一, 森 浩二, 山下修蔵: 精密工学会誌, **73** (5), 515 (2007)
- 6) 西正吾, 石川正恒, 中山康秀, 植田初江, 松田武久: 日本人工臓器学会 人工臓器, **29** (1), 257 (2000)
- 7) S. Park, K. Koo, D. Cho, S. M. Bang, J. Y. Park and S. Y. Song: J Micromech Meicroeng, **18** (2), 025032 (2008)
- 8) S. Iguchi, H. Kudo, T. Saito, M. Ogawa, H.Saito, K. Otsuka and K. Mitsubayashi: Biomed Microdevices, **9** (4), 603 (2007)
- 9) 澤田廉士: 医科学応用研究財団研究報告, **24** 61 (2007)
- 10) 丸山茂夫 他: マイクロ・ナノ熱流体ハンドブック, (株)エヌティーエス, 2006), pp.5-15
- 11) 吉田潤一, 北森武彦ら: マイクロリアクタテクノロジー～限らない可能性と課題～, (株)エヌティーエス, 2005)
- 12) (社)高分子学会編: ナノバイオー微細加工と計測技術の新展開, (株)エヌティーエス, 2005), p.38
- 13) S. c. Terry, J. H. Jerman and J. B. Angell: IEEE Trans. Electon Devices, **ED-26**, 1880 (1979)
- 14) A. Manz, N. Graber and H. M. Widmer: Sensors and Actuators B, **1**, 244 (1990)
- 15) A. Manz : Tech Dig IEEE Micro Electro Mech Syst, **10**, 14 (1997)
- 16) 生田幸士, 広渡憲: 日本ロボット学会学術講演会予稿集, **11** (2), 553 (1993)
- 17) T. Ohori, S. Shoji, K. Miura and A. Yotumoto: Tech Dig IEEE Micro Electro Mech Syst, **10**, 333 (1997)
- 18) 日本生物物理学会ホームページ : <http://www.biophys.jp/>
- 19) 北森武彦 他: 化学とマイクロ・ナノシステム研究会誌, **6** (1), 2 (2007)

- 20) T. Kamei, M. B. Paegel, R. J. Scherer, M. A. Skelley., A. R. Mathies and A. R. Street: *Anal. Chem.*, **75** (20), 5300 (2003)
- 21) 亀井利浩: 産総研 TODAY, **6** (12), 20 (2006)
- 22) C. Robillot, J. Fitzpatrick, S. Grimmer, B. Kettle, D. Dadic and K. Drese: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, (Tokyo, 2006), 1229 (2006)
- 23) A. Hibara, T. Saito, H. Kim, M. Tokeshi, T. Ooi, M. Nakao and T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **74**, (24), 6170 (2002)
- 24) M. Tokeshi, K. Uchiyamada, T. Kitamori, T. Minagawa, A. Hibara, K. Sato and H. Hisamoto: *Anal. Chem.*, **74**, (7), 1565 (2002)
- 25) T. Kitamori, M. Tokeshi, A. Hibara and K. Sato: *Anal. Chem.*, **76**, 52A-60A (2004)
- 26) E. Tamaki, K. Sato, M. Tokeshi, K. Sato, M. Aihara and T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **74** (7), 1560 (2002)
- 27) 渡慶次学, 馬渡和真, 火原彰秀, 北森武彦: 応用物理学会誌, **73** (6), 741 (2004)
- 28) マイクロ化学技研株式会社ホームページ: <http://www.i-mt.co.jp/>
- 29) 株式会社島津製作所ホームページ:
<http://www.shimadzu-biotech.jp/products/multina/index.html>
- 30) 株式会社島津製作所ホームページ: <http://www.shimadzu.co.jp/news/press/070827.html>
- 31) 株式会社三ツワフロンテックホームページ:
http://www.mitsuwa.co.jp/goods/goods/fluid_rifs/fluid_rifs.html
- 32) 江刺正喜 監修: マイクロマシン, (産業技術サービスセンター, 2002), pp.462-501
- 33) 日本経済新聞社, 日経産業消費研究所編: 日経先端技術, (日本経済新聞社, 2003), **42**, pp.13-16
- 34) 堀池靖浩, 宮原裕二: バイオチップとバイオセンサー, (共立出版, 2006), pp.26-43
- 35) T. Ichiki, Y. Sugiyama, R. Taura, T. Koidesawa and Y. Horiike: *Thin Solid Films*, **435**, 62 (2003)
- 36) M. Kanai, T. Munaka, H. Abe, Y. Fujiyama, D. Uchida, H. Mikado, H. Nakanishi and S. Shoji: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2004*, (Malmo, Sweden, 2004), 1, 126 (2004)
- 37) 内海裕一: バルブ技報, **23** (1), 77 (2008)
- 38) 丹羽修: *Chem. Sens.*, **19** (2), 44 (2003)

- 39) 山形豊, 吉田和史, 牧野俊清, 樋口俊郎, 鈴木浩文: 2007 年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集, B37 (2007)
- 40) 平晋一郎, 吉岡正人: 砥粒加工学会誌, **51** (2), 112 (2007)
- 41) C. A. MILLS et al.: J Nanoscience Nanotechnology, **7** (12), 4588 (2007)
- 42) 藤井輝夫, 細川和生, 遠藤勲, WOOK H J, 関 実: 電気学会化学センサシステム研究会資料, **CS-99**, 19 (1999)
- 43) N. Kitamura, H. B. Kim and K. Ueno: Trans. IEE Jpn. **121-E**, 169 (2001)
- 44) F. Wagner and P. Hoffmann: *Proc. SPIE*, **4088**, 337 (2000)
- 45) Y. Sun, Y. C. Kwok and N. Nguyen: J Micromech Microeng, **16** (8), 1681 (2006)
- 46) Y. Yoshida: *Proc. SPIE*, **5063**, 189 (2003)
- 47) 吉田善一: マイクロマシン・センサシステム研究会講演集(電気学会), **MSS-04**, 49 (2004)
- 48) P. Sethu, M. Anahtar, L. L. Moldawer, R. G. Tompkins and M. Toner: Anal. Chem., **76**, 6247 (2004)
- 49) Y. Horiike, H. Koda, S.-H. Chang, R. Ogawa, S. Hashioka, M. Nagai and H. Ogawa: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, (Tokyo, 2006), 1558 (2006)
- 50) X. Cheng, D. Irimia, M. Dixon, K. Sekine, U. Demirci, L. Zamir, R. G. Tompkins, W. Rodriguez and M. Toner: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, (Tokyo, 2006), 1561 (2006)
- 51) S. S. Shevkoplyas, T. Yoshida, L. L. Munn and M. W. Bitensky: Anal. Chem., **77**, 933 (2005)
- 52) L. Li, J. Q. Boedicker and R. F. Ismagilov: Anal. Chem., **79**, 2756 (2007)
- 53) A. K. Price, D. J. Fischer, R. S. Martin and D. M. Spence: Anal. Chem., **76**, 4849 (2004).
- 54) S. K. Kim, J. H. Kim, K. P. Kim and T. D. Chung: Anal. Chem., **79**, 7761 (2007)
- 55) 片岡正俊: 産総研 TODAY 2008.04, **8**, (4), 24 (2008)
- 56) E. Maeda, M. Kataoka, Y. Shinohara, N. Kaji, M. Tokeshi and Y. Baba: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, (Tokyo, 2006), 813 (2006)
- 57) S. S. Lee, Y. Yim, K. H. Ahn and S. J. Lee: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, (Tokyo, 2006), 461 (2006)
- 58) C. Blattert, R. Jurischka, I. Tahhan, A. Schoth and H. Reinecke: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, (Tokyo, 2006), 359 (2006)

- 59) M. Yamada, M. Matsuda and M. Seki: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, (Tokyo, 2006), 1052 (2006)
- 60) 扶桑薬品工業株式会社ホームページ :
<http://www.bekkoame.ne.jp/tuguharu/data/product/huso/istat/istat.htm>
- 61) ローム株式会社ホームページ : <http://www.rohm.co.jp/news/080930.html>
- 62) Y. Sun, L. C. Ng, S. K. Chua, X. M. Zhang, P. Droge, T. C. Ayi, P. H. Yap and A. Q. Liu: *Proc. Int. Conf. Electrical Engineering 2004*, (Sapporo, 2004), 267 (2004)
- 63) U. Larsen, B. Ekberg, M. Jensen: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2004*, (Malmo, Sweden, 2004), 1, 46 (2004)
- 64) T. Ichiki, T. Ujiie, T. Hara, Y. Horiike, and K. Yasuda: *Proc. Micro Total Analysis Systems '01*, (Monterey, 2001), 271 (2001)
- 65) D. P. Schrum, C. T. Cubertson, Jacobson and J. M. Ramsey: *Anal. Chem.*, **71**, 4173 (1999)
- 66) 田邊力也, 秦 誠一, 下河辺 明: 精密工学会誌, **74** (7), 746 (2008)
- 67) M. Rieseberg, C. Kasper and K. F. Reardon: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 350 (2001)
- 68) 山田博之, 吉田善一, 寺田信幸, 田原 列, 山田 潤: レーザ加工学会誌, **12** (4), 244 (2005)
- 69) 山田博之, 吉田善一, 寺田信幸, 萩原 茂, 寺澤章裕: 精密工学会誌, **73** (9), 1035 (2007)
- 70) H. Yamada, Y. Yoshida and N. Terada: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **44** (12), 8739 (2005)
- 71) H. Yamada, Y. Yoshida, N. Terada, S. Hagihara, T. Komatsu and A. Terasawa: *Rev. Sci. Instrum.*, **79** (12), 124301 (2008)
- 72) 山田博之, 吉田善一, 寺田信幸, 萩原茂, 小松利安, 寺澤章裕: 2008 年度精密工学会秋季大会講演論文集, 543-544 (2008)

第2章 マイクロ加工技術とマイクロ流路作製技術

2.1 緒言

μ TASは、流体試料の注入、混合、攪拌、分離、抽出を行う機構部品や、流路、溜池、検出、測定などの流体分析に必要な要素を小型・集積化したデバイスであり、対象分野としては、医療・創薬・化学・バイオ・食品・環境・エレクトロニクスなど多くの分野への応用が考えられる。したがって、マイクロ流体デバイスに用いる材料には以下のような特徴が主に要求されると考えられる。

- ① 接合容易性 : 加工された溝に天板を接合し流路を形成するため表面特性
- ② 光透過性 : 光を用いた検出や測定を行うための特性
- ③ 電極作り込み容易性 : 電氣的な流体駆動や測定を行うための特性
- ④ 耐薬品性 : 試料や試薬に対する耐薬品性
- ⑤ 耐熱性 : 反応熱などに対する材料強度
- ⑥ 表面エネルギー制御性 : 濡れ性など液体への接触による影響
- ⑦ 生体適合性 : 生体物質を取り扱う場合

このような材料への要求に対して、これまでにマイクロ流体デバイスの材料として、シリコンウェハ、石英ガラス、樹脂材料、シリコーンゴム、ステンレス、リポソームなどが用いられている。これらの材料は上記の特性に加えて加工やコストなど様々な特徴においてそれぞれ利点と欠点があるため、 μ TASの研究開発においては材料の適性も検討し、目的に応じた材料を選択することが必要である。本研究では、日常のヘルスケアなどに利用できる血液検査用 μ TASの作製を目標としているため、材料は安価で、種類も多く、レーザなどによる加工も容易で、成形加工などでは大量生産も可能であるという特徴をもつ樹脂材料が最適であると考えた。

これまでにマイクロ流体デバイスの主な加工方法としては、エッチングをはじめとする半導体プロセス、機械加工、ナノインプリント、レーザ加工などが報告されている。これらの加工方法には加工寸法、形状精度、加工表面粗さ、加工速度、製造コストなどにおいてそれぞれ利点と欠点がある。また本研究では、多種多様な流路形状に対応するためにはレーザ加工が最適であると考えた。そこで、樹脂材料に対し非熱でアブレーション加工が可能な紫外線レーザに着目し^{1,2)}、エキシマレーザによるマイクロ加工技術の検討を行った。

μ TASにおいてマイクロ流路の幅と深さを小さくしていくと、マイクロ流路内の流れ

は層流に近づく。流路幅に対する壁面の表面粗さの相対比は大きくなるが、層流は壁面の粗さの影響を受けにくいことから、その流れは理論的な流れに近くなると考えられる。しかし、実際のマイクロ流路における流れの圧力損失の測定結果によると、レイノルズ数が0.01以下の低レイノルズ数領域においても表面粗さの影響があることが報告されている^{3,4)}。したがって、流路を形成するための微細溝や微小穴における表面粗さが重要となるため、加工表面粗さに対するレーザ加工技術の検討も行う必要がある。

マイクロ流体デバイスの作製方法として、1.1.3.(A)節で述べたような樹脂ラミネート法とレーザ加工を用いるが、ラミネート接着による樹脂フィルムの積層方法では、ラミネートの際に熱と圧力により流路が潰れてしまう可能性がある。そこでこれを防止するための素材として熱硬化性で強度も高いポリイミドに注目した。また、 μ TASの医療分野への適用を考えた場合に、血液などが流れることによってタンパク質などで流路壁面が汚れ、マイクロ流路が詰まってしまうことが予想される。そこで撥水性や耐薬品性、光透過性に優れたフッ素樹脂にも注目した。フッ素樹脂はポリイミドなどの他の樹脂材料に比べてレーザの透過性が高いため、加工性が悪い。表面改質技術の研究、レーザ吸収剤をドーブさせた材料に対する加工技術の研究など、加工性を向上するためにフッ素樹脂材料を改質する研究がなされている⁵⁻⁷⁾。しかし、本研究ではフッ素樹脂の表面特性が必要であり、改質やドーブは利用できない。そこで、波長が異なる2種類の紫外線レーザによる加工条件の検討や、3種類のフッ素樹脂材料への加工について検討を行った。最後に、熱硬化性ラミネートフィルムやフッ素樹脂フィルムを使用した場合について、レーザ加工と樹脂ラミネート法を用いたマイクロ流路作製技術の最適化について検討を行った。

2.2 実験装置および材料

レーザ加工は図 2-1 に示すような Exitech 社製のエキシマレーザ加工機 PS2000 (発振機: LAMBDA PHYSIK 社製 LPX200i) を用いた。レーザ加工機の主な仕様を表 2-1 に示す。さらに、図 2-2 および図 2-3 にエキシマレーザ加工機における光学系の概略図を示す。ガスの種類を変更することによって 248nm と 193nm の 2 波長のレーザが発振可能である。また、縮小光学系レンズを変更することによってレーザの集光倍率を変更でき、イメージングマスクおよびイメージングアパーチャ上の像を加工物上に結合するマスクプロジェクション法によってビーム形状を成形できる。集光倍率 4 倍と 10 倍の縮小光学系の場合には、ホモジナイザ光学系が設けられており、図 2-4 に示すようにレーザの強度分布はトップハットの分布である。

マイクロ流体デバイスの作製において、ラミネート接着による樹脂フィルムの積層方法では、図 2-5 に示す流路の断面図のように、ラミネートの際に熱と圧力により流路が潰れてしまう可能性がある。そこでこれを防止するための素材として熱硬化性樹脂で強度も高いポリイミドを用いた。一方、本デバイスでは血液などの生体物質を対象とするため、撥水性や耐薬品性、光透過性に優れたフッ素樹脂も用いた。そこで、これらの材料に対してエキシマレーザによるマイクロ加工技術の検討を行った。

はじめに、カバーガラスに熱硬化性ラミネートフィルムを接着し、エキシマレーザによるマイクロ加工技術の検討を行った。熱硬化性樹脂にはポリイミドを選択し、ラミネートフィルムはニッカン工業(株)製ニカフレックスを使用した。図 2-6 および図 2-7 に示すように、厚さ $25\mu\text{m}$ のポリイミド層と、厚さ $20\mu\text{m}$ の接着層とを含めた熱硬化性ラミネートフィルムの総厚さは $45\mu\text{m}$ である。一方、フッ素樹脂には、流体の観察ができるように無色透明のフィルムである PFA (パーフルオロアルキルコキシアルカン) と FEP (パーフルオロエチレンプロペンコポリマー)、およびラミネート接着が必要になるため接着性を向上させたダイキン工業(株)製ネオフロン EFEP⁸⁾の 3 種類のフッ素樹脂を用いて加工実験を行った。図 2-8 に示すように、フィルムの厚さは全て $100\mu\text{m}$ である。図 2-9 にフッ素樹脂 EFEP の外観写真を示す。フッ素樹脂の主な物性を表 2-2 に示す。また、基板には $24\text{mm} \times 60\text{mm} \times 0.23\text{mm}$ の松波硝子工業(株)製カバーガラスを用いた。ラミネート接着に使用したラミネータは、一般的な事務機器であるコクヨ(株)製パウチ KLM-HA110 および KLM-HA230 を用いた。

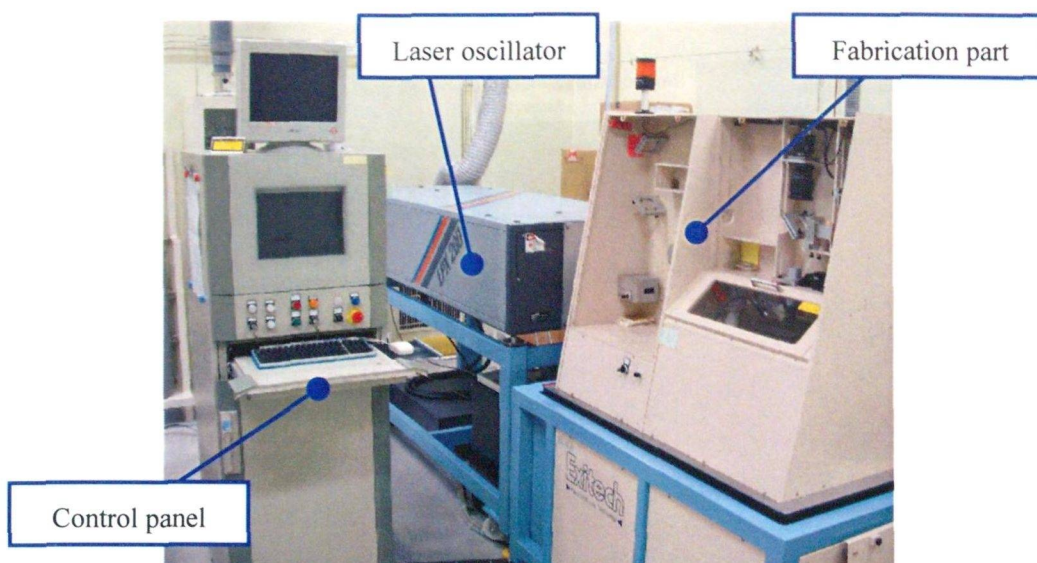


図 2-1 エキシマレーザ加工機

表 2-1 エキシマレーザ加工機の主な仕様

| | K r F レーザ | A r F レーザ |
|------------------|-----------------------------------|--------------------|
| レーザ波長 | 248 nm | 193 nm |
| 発振周波数 | 1～200 Hz | 1～200 Hz |
| 最大パルスエネルギー | 450 mJ | 275 mJ |
| 最大出力 | 80 W | 45 W |
| 縮小光学系倍率 | 1/4@KrF (4×lens) | 1/4@ArF (4×lens) |
| | 1/10@KrF (10×lens) | |
| | 1/30@KrF (30×lens) | 1/30@ArF (30×lens) |
| パルス幅 | 20 nsec | |
| 最大加工物寸法 | 200 mm×200 mm×100 mm | |
| 加工ステージ制御軸 | X 軸, Y 軸, Z 軸, 及びレーザの同時制御 | |
| ステージ移動量 | 200 mm×200 mm×5 mm | |
| ビーム成形方法 | マスクプロジェクション法 | |
| 加工精度 | 最小 2 μm | |
| 手動式イメージングアパーチャ | X－Y 2 軸マニュアル位置調整可能(0～13mm) | |
| 加工時の加工点の観察 | 被加工物観察装置 (CCD カメラ, 観測用モニタ) | |
| 加工部の表面観察 | Off-axis-aligner-camera (20 倍レンズ) | |
| レーザ減衰機構(アッティネータ) | 減衰率 90～10%(ArF,ArF)の連続可変 | |

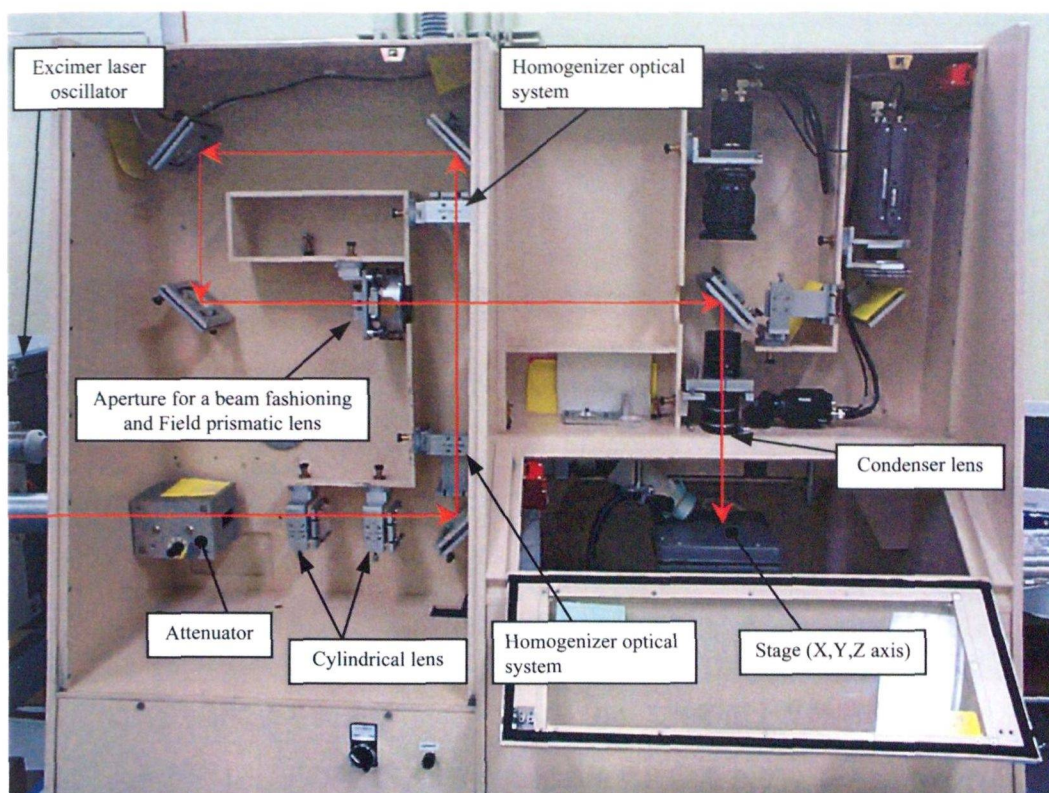


図 2-2 エキシマレーザ加工機の加工機内部

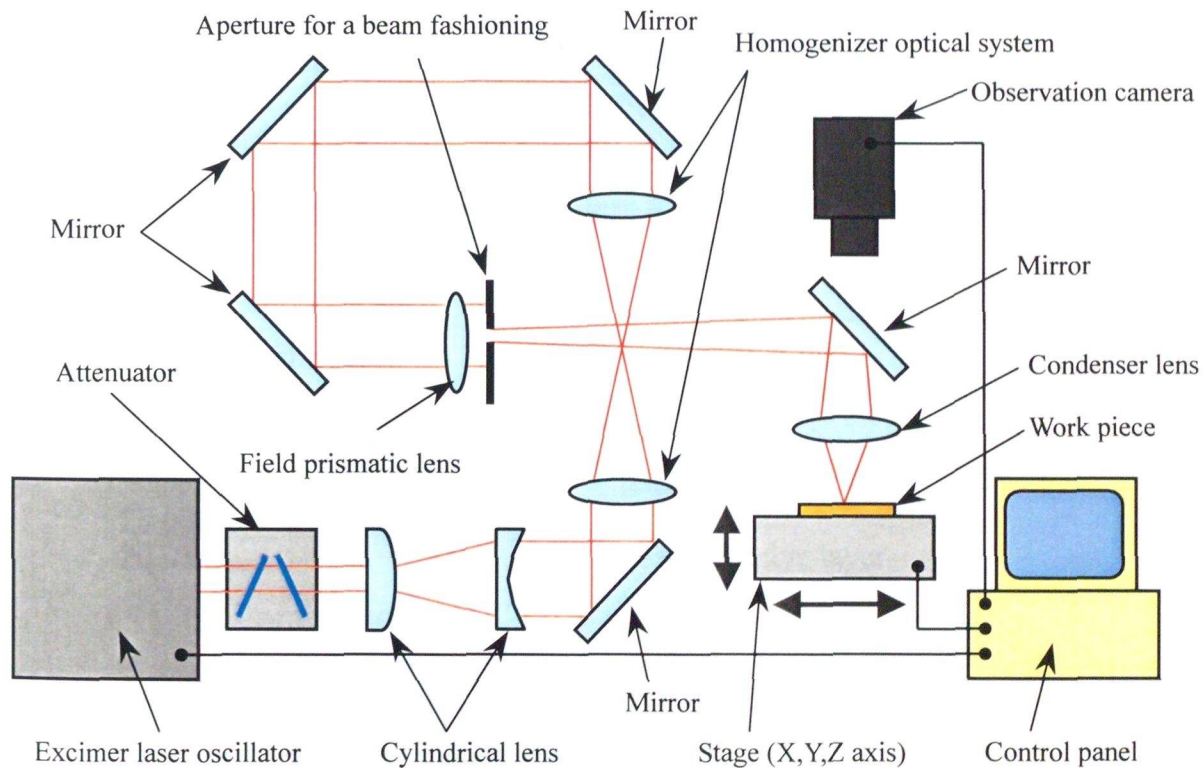
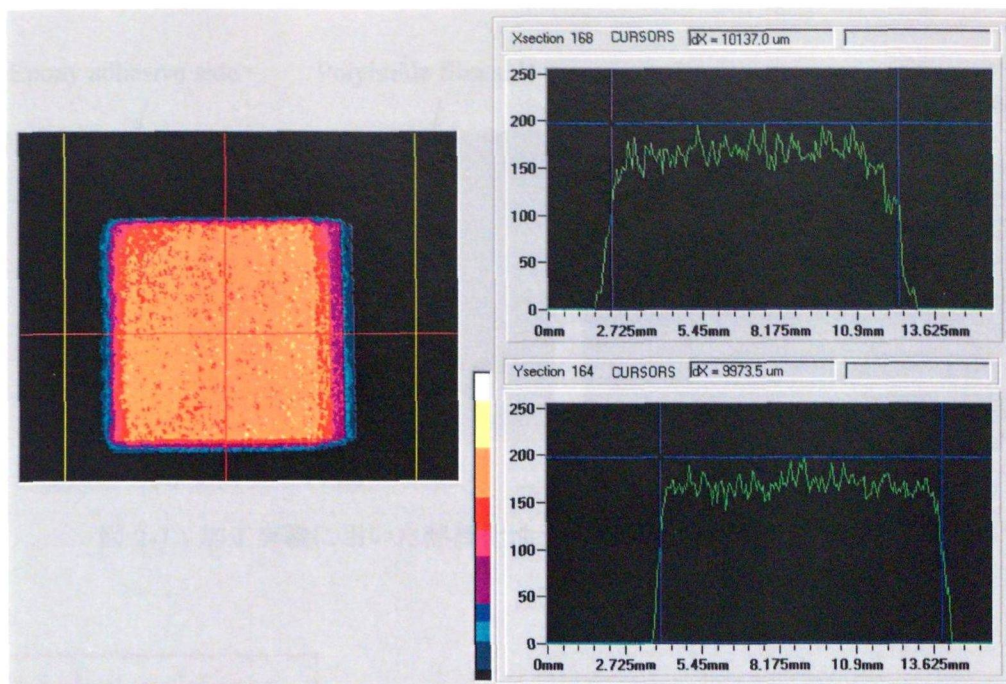


図 2-3 エキシマレーザ加工機の構成



(a) 色分布による面表示

(b) X軸断面とY軸断面の分布

図 2-4 エキシマレーザの強度分布（ホモジナイザ光学系あり，アパーチャーなし）

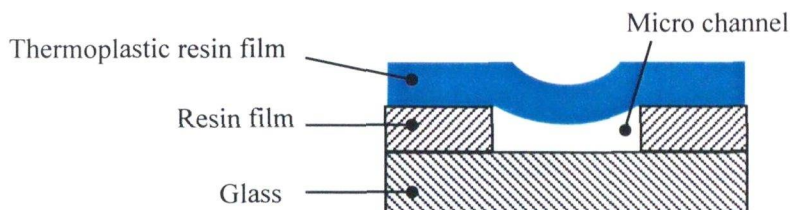


図 2-5 熱可塑性樹脂を用いた場合の樹脂ラミネート法による流路断面図

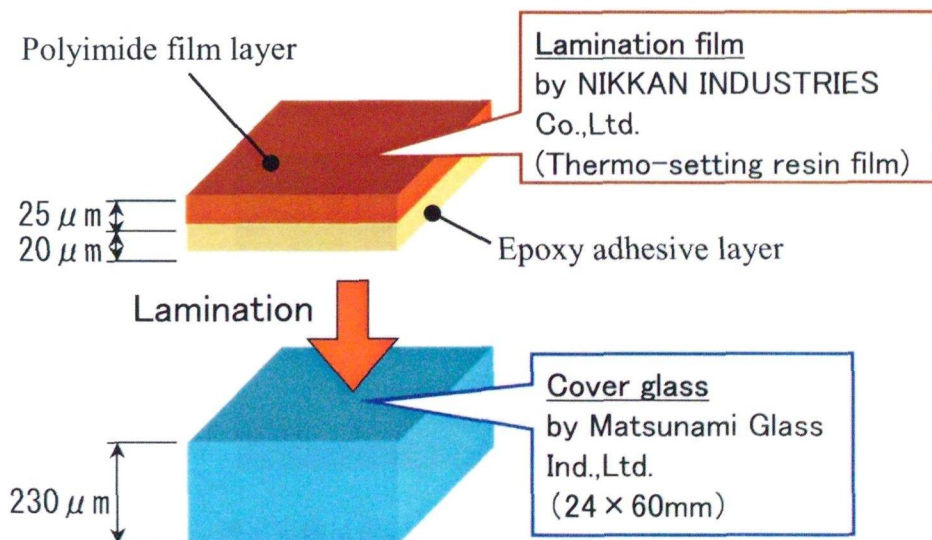


図 2-6 加工実験に用いた熱硬化性ラミネートフィルム

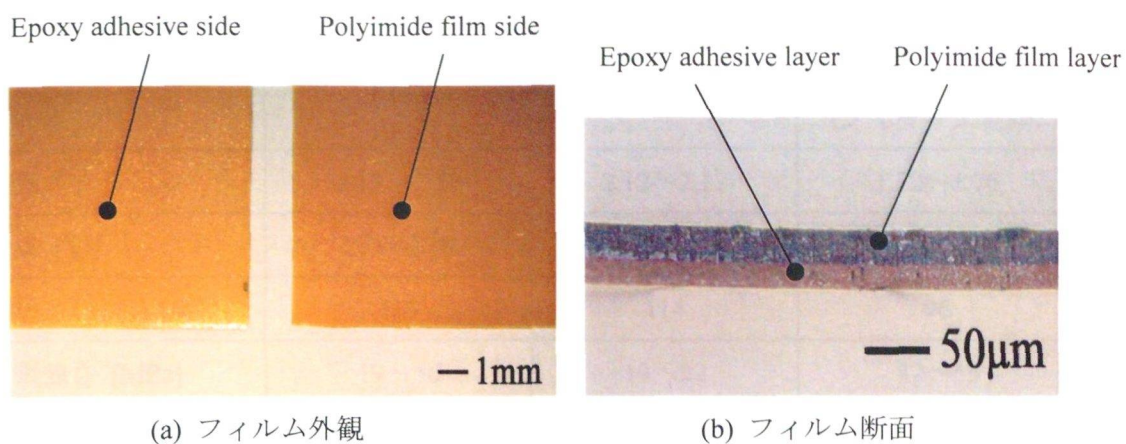


図 2-7 加工実験に用いた熱硬化性ラミネートフィルムの外観写真

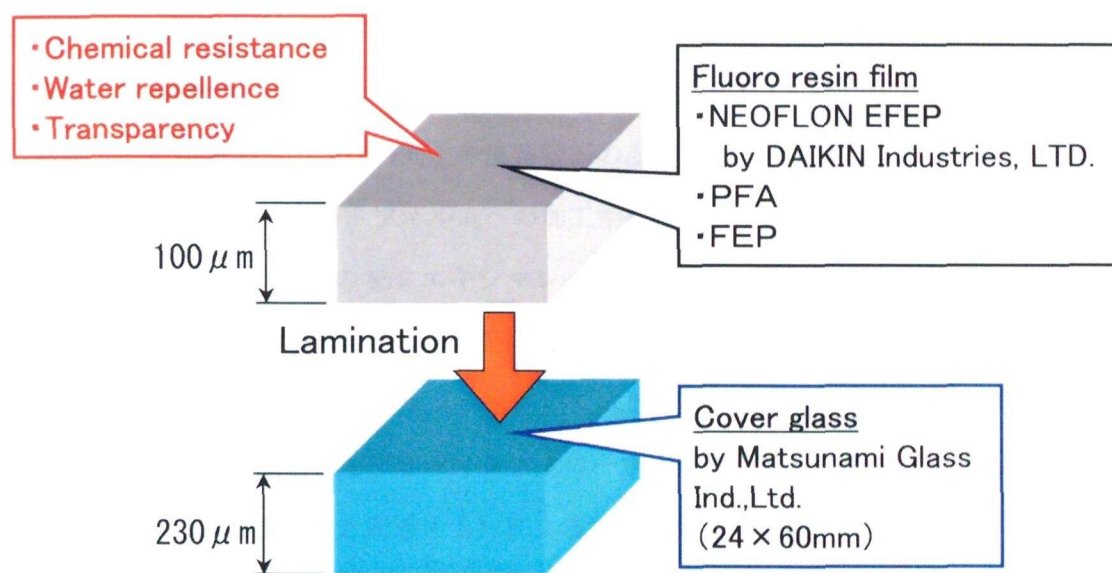


図 2-8 加工実験に用いたフッ素樹脂フィルム

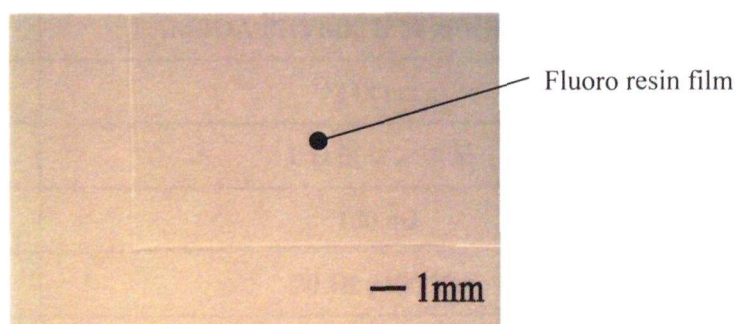


図 2-9 加工実験に用いたフッ素樹脂フィルムの外観写真

表 2-2 フッ素樹脂の主な物性

| | PFA | FEP | EFEP (RP-4020) (ダイキン工業㈱) |
|-------------|-----------|-----------|-----------------------------|
| 比重 | 2.12～2.17 | 2.12～2.17 | 1.72～1.76 |
| 融点 [°C] | 295～310 | 270 | 155～170 |
| 接触角(対水) [度] | 115 | 114 | 96 |
| 引張強さ [MPa] | 19～56 | 19～22 | 42～55 |
| 曲げ弾性率 [MPa] | 647～686 | 539～637 | 1300 |
| ポリイミドとの接着性 | × | × | ○ |

2.3 レーザによるラミネートフィルムへのマイクロ加工技術

2.3.1 熱硬化性ラミネートフィルムへのレーザ加工

微細穴や微細溝の加工形状の向上や流路壁面の面粗さ向上を目的として、エキシマレーザによる熱硬化性ラミネートフィルムへの加工条件について検討した。主な加工条件を表 2-3 に示す。波長が 248nm の KrF エキシマレーザを使用し、縮小光学系倍率が 10 倍のレンズ系を使用した。ビーム形状は焦点位置において $\phi 53 \mu\text{m}$ および $103 \mu\text{m} \times 103 \mu\text{m}$ のビームになるようにアパーチャーマスクを用いて成形した。加工面の評価には、レーザ顕微鏡による形状・寸法測定とビデオマイクロスコープや走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope, 以下はSEMと記述する) による表面観察を用いた。

表 2-3 ポリイミドフィルムの主な加工条件

| | |
|------------------|---|
| 加工装置 | Exitech 社製エキシマレーザ加工機 PS2000 LAMBDA PHYSIK 社製発振機 LPX200i |
| レーザ波長 | 248 nm |
| 縮小光学系倍率 | 10 倍レンズ系 |
| 発振エネルギー | 150 mJ |
| 発振周波数 | 20 Hz, 100 Hz |
| マスク寸法 (ビーム形状) | 1.03mm×1.03mm, $\phi 0.53\text{mm}$ ($103 \mu\text{m} \times 103 \mu\text{m}$, $\phi 53 \mu\text{m}$) |

エキシマレーザのエネルギー密度すなわちフルエンスを決定することを目的として熱硬化性ラミネートフィルムに $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ の矩形穴を加工した。この時の1パルス当たりのフルエンスと加工深さ及び加工穴寸法との関係を調べた結果を図 2-10 に示す。フルエンスが増加すると除去加工量も増加するが、加工穴の開口寸法はほとんど変化しないことから、フルエンスが大きくなれば加工効率が良くなることがわかる。

次に、樹脂部のみに流路となる微細溝を加工するために、レーザによってカバーガラスにダメージを与えないエネルギーの上限値を調べた結果、図 2-11 に示すようにフルエンスが約 0.75 J/cm^2 以下ではカバーガラスは加工されないことがわかった。

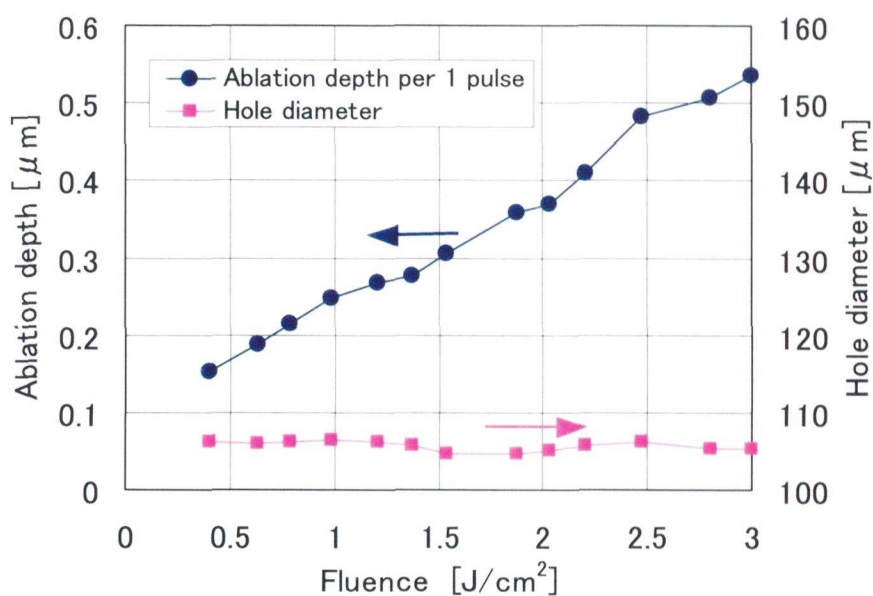


図 2-10 フルエンスと加工深さ及び加工穴寸法

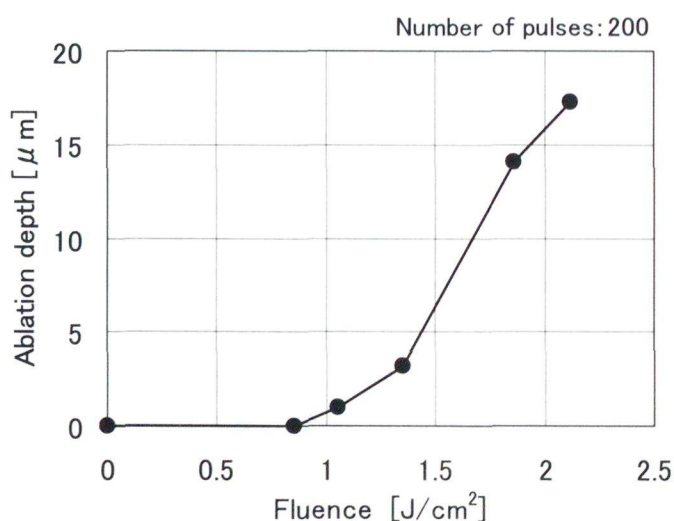


図 2-11 フルエンスとカバーガラスへの加工深さとの関係

次に、熱硬化性ラミネートフィルムに対してフルエンス 0.75 J/cm^2 におけるレーザ照射パルス数と加工深さとの関係を調べた結果を図 2-12 に示す。同一材料では加工深さと照射パルス数はほぼ比例関係にあり、アスペクト比が 1 前後の加工形状では加工深さの制御が比較的容易であることが確認できた。そこで、図 2-13 に示すように、ラミネートフィルムの厚さに相当する深さとなる溝に加え、レーザ照射パルス数を変化させて加工深さを制御することによって必要に応じた溝深さも樹脂部に作製できる。レーザ加工面がポリイミド層の場合の SEM 観察写真を図 2-14 に示し、レーザ加工面が接着層の場合の SEM 観察写真を図 2-15 に示す。ポリイミド層におけるレーザ加工底面は良好な加工面粗さであるが、接着層におけるレーザ加工底面は面粗さが大きいことがわかる。マイクロ流路の壁面は表面粗さが小さい方が望ましいため、溝底面がポリイミド層になるような溝深さすなわち流路深さとなるように流路を設計する。

また、レーザの照射パルス数と加工穴の寸法との関係を調べた結果を図 2-16 に示す。レーザを照射した側の穴径の変化は少ない。しかし、照射パルス数が増加すると加工深さも増加する反面、加工穴底面の穴径が小さくなってしまいうことから、加工穴の側面がテーパになることがわかる。フルエンスが大きいほど側面のテーパは減少する傾向があり、フルエンスが 0.75 J/cm^2 前後ではおよそ 10.9° であり、 1 J/cm^2 前後ではおよそ 7.8° であった。

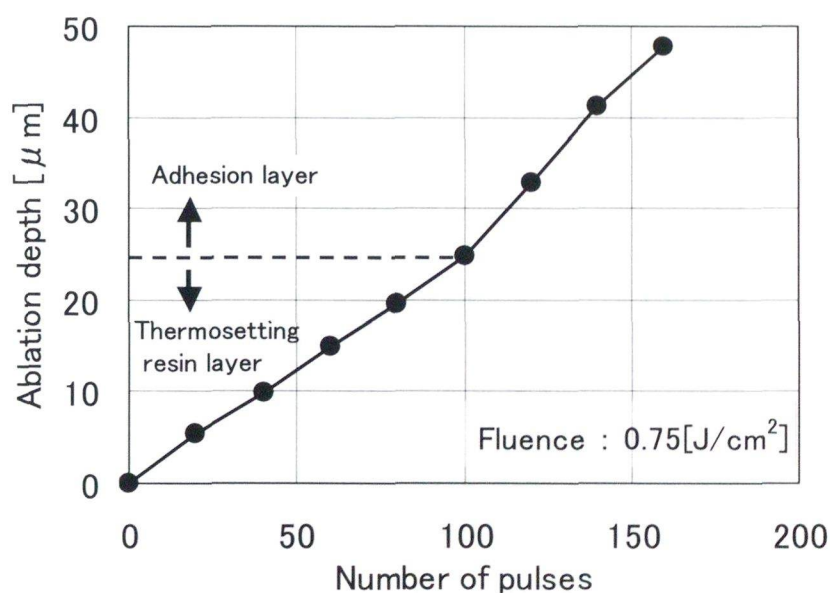


図 2-12 レーザ照射パルス数とラミネートフィルムへの加工深さとの関係

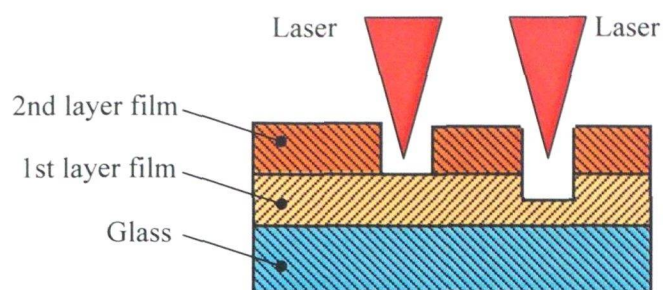


図 2-13 ラミネートフィルムを積層した時の溝加工例のイメージ図

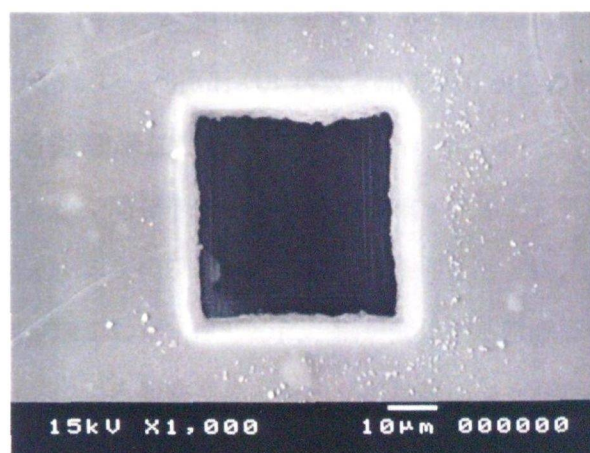


図 2-14 レーザ加工面がポリイミド層の場合のSEM観察写真

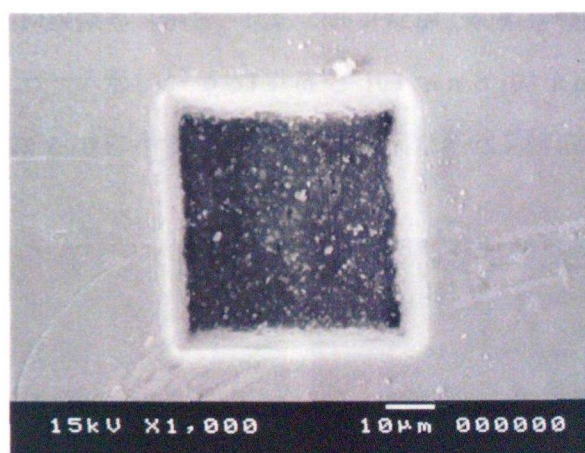


図 2-15 レーザ加工面が接着層の場合のSEM観察写真

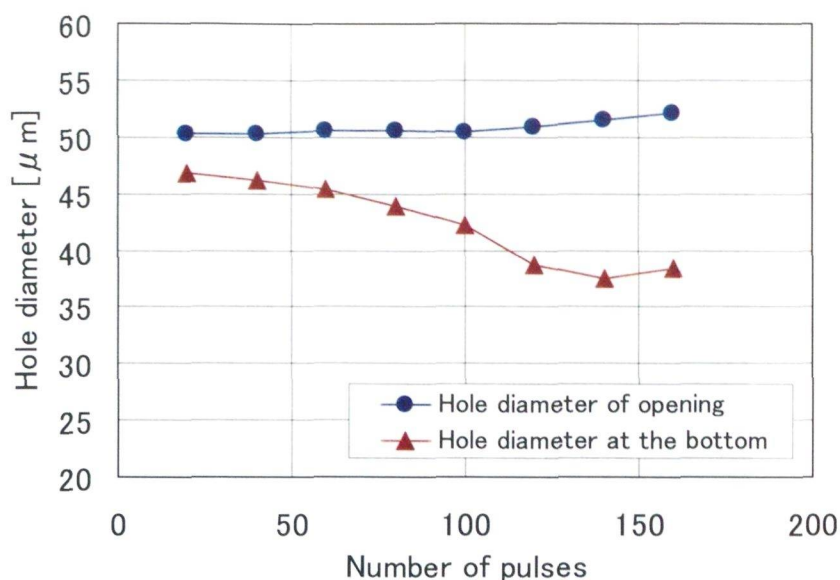


図 2-16 レーザ照射パルス数と加工穴寸法との関係

2.3.2 レーザによる微細溝加工

マイクロ流路となる微小空間を形成するための微細溝の加工を試みた。カバーガラスに熱硬化性ラミネートフィルムを接着し、前節の加工条件をもとに、レーザをスキャンさせることによって微細溝を加工した。はじめに、幅が変化する微細溝を加工したサンプルのビデオマイクロスコープによる観察写真とレーザ顕微鏡による測定結果を図 2-17 に示す。深さが $45\mu\text{m}$ で、幅が $58\mu\text{m}$ から $145\mu\text{m}$ に変化する溝である。次に、三叉構造の微細溝を加工したサンプルを SEM で観察した写真を図 2-18 に示し、レーザ顕微鏡による測定結果を図 2-19 に示す。深さが $45\mu\text{m}$ で、幅が $38\sim 55\mu\text{m}$ であり、溝の側面はゆるやかなテーパ形状である。SEM 観察写真から、比較的良好な加工面粗さの微細溝が得られていることがわかる。また、ビーム形状が $\phi 53\mu\text{m}$ と $103\mu\text{m} \times 103\mu\text{m}$ の 2 つのビームを使用することによって、図 2-20 に示すような溝深さが異なる三叉構造の微細溝を加工することができた。

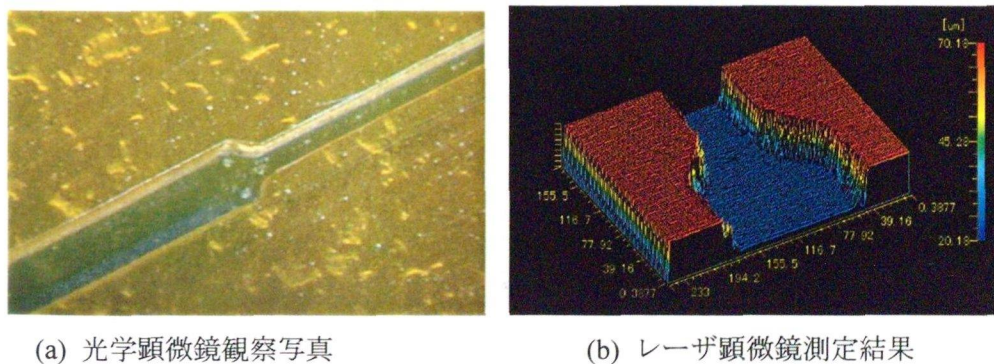


図 2-17 幅寸法が変化する微細溝の光学顕微鏡観察写真とレーザ顕微鏡測定結果

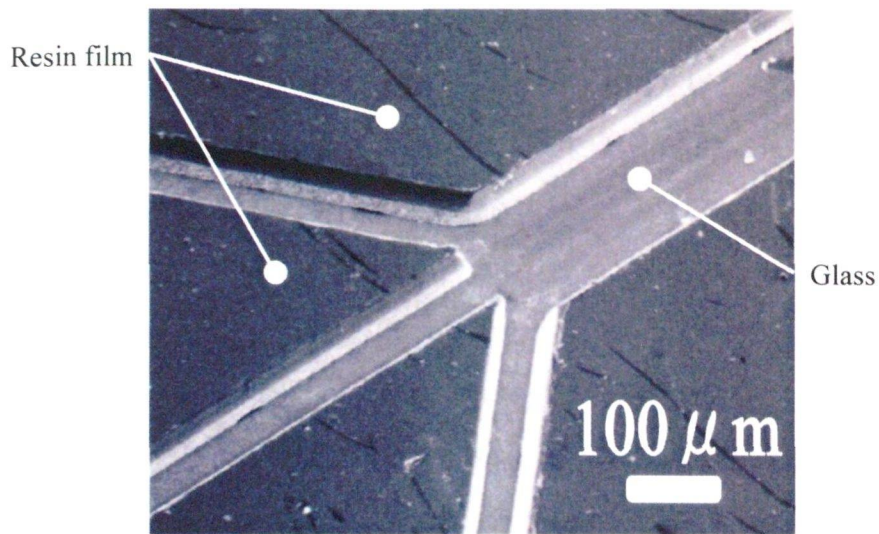


図 2-18 三又構造の微細溝のSEM観察写真

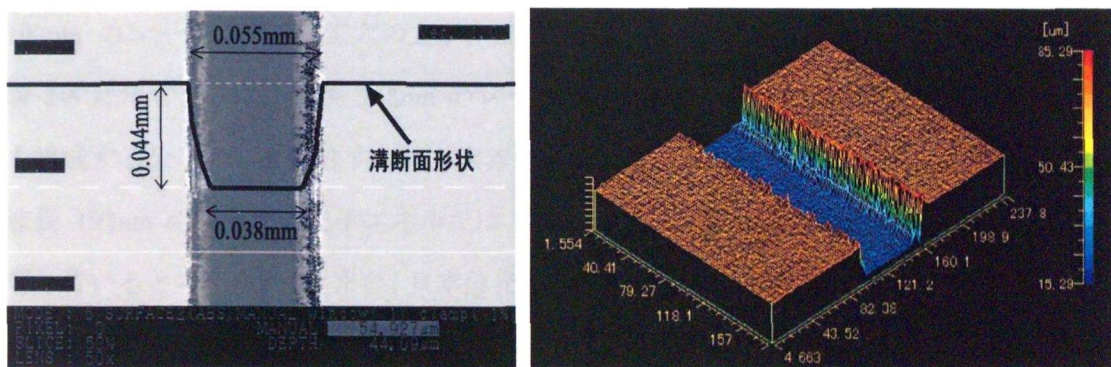


図 2-19 三又構造の微細溝のレーザ顕微鏡測定結果

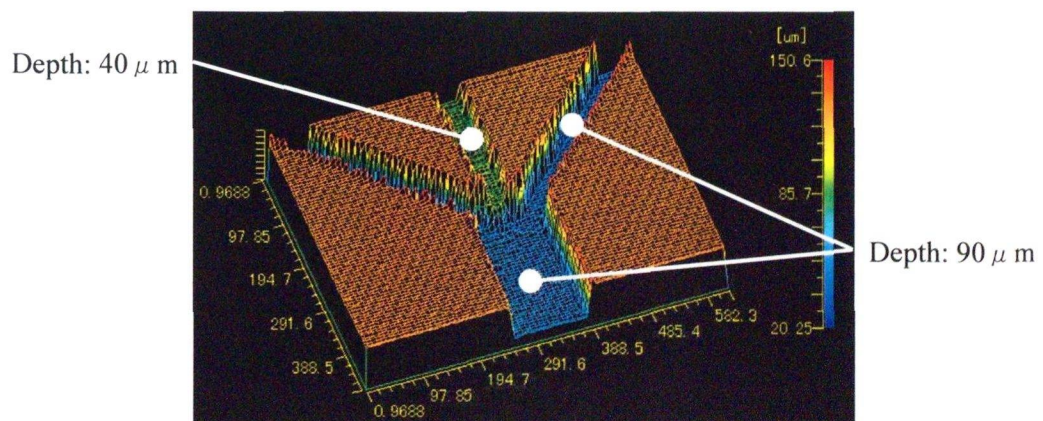


図 2-20 溝深さが異なる微細溝のレーザ顕微鏡測定結果

2.4 レーザによるフッ素樹脂へのマイクロ加工技術

2.4.1 フッ素樹脂への溝加工

はじめに、流路を形成するための溝加工への適用を目的として、波長 248nm の KrF エキシマレーザと波長 193nm の ArF エキシマレーザによって $100\mu\text{m}$ の矩形形状の止め穴加工を行い、波長の違いによる加工への影響を調べた。主な加工条件を表 2-4 に示す。ビームは光学系に矩形アパーチャを挿入し、集光によるビームの最小寸法は $100\mu\text{m}\times 100\mu\text{m}$ とした。2.2 節で述べたように、フッ素樹脂フィルムには、PFA、FEP、およびダイキン工業(株)製ネオフロン EFEP の 3 種類を用いた。

図 2-21 は、EFEP のフィルムに、波長 248nm、フルエンス $7\text{J}/\text{cm}^2$ と $12\text{J}/\text{cm}^2$ の条件、および波長 193nm、フルエンス $7\text{J}/\text{cm}^2$ と $12\text{J}/\text{cm}^2$ の条件でそれぞれ加工した穴の SEM 観察写真である。波長 248nm のレーザによる加工穴の寸法は約 $150\mu\text{m}$ であり、波長 193nm のレーザによる加工穴の寸法は約 $100\mu\text{m}$ である。波長 248nm のレーザに比べて波長 193nm のレーザによる加工穴の方が、加工形状がビームの形状に近い形状となっている。表 2-5 に示すように、波長 248nm のレーザの光子エネルギーは 5.0eV であり、フッ素樹脂を構成する分子の C-F 結合すなわち炭素とフッ素の結合エネルギー 5.6eV よりも低く、逆に波長 193nm のレーザの光子エネルギーは 6.4eV であり、結合エネルギーよりも高いことが影響していると考えられる。また、日本分光製の紫外可視分光光度計 V-570 を用いて厚さ $100\mu\text{m}$ の EFEP フィルムの透過率を測定した結果を図 2-22 に示す。波長 248nm の場合は 85%T、波長 193nm の場合は 31%T であった。この結果から、波長 193nm のレーザは波長 248nm のレーザに比べて吸収が大きいため、波長 193nm のレーザの方が吸収されるレーザエネルギーが大きく、これによって加工のために与えられるエネルギーも大きいと考えられる。

次に、フッ素樹脂の種類による除去加工量と加工面荒れを調べることを目的として、波長 193nm のエキシマレーザによって $100\mu\text{m}\times 100\mu\text{m}$ の矩形形状の止め穴加工を行った。図 2-23 は 3 種類のフッ素樹脂フィルムについて、波長 193nm、フルエンス $4.0\text{J}/\text{cm}^2$ 、 $6.3\text{J}/\text{cm}^2$ 、 $8.0\text{J}/\text{cm}^2$ 、照射回数 200 パルス、ビーム寸法 $100\mu\text{m}\times 100\mu\text{m}$ の条件で加工した穴の SEM 観察写真である。PFA と FEP は、比較的大きなフルエンスを与えても、フィルム内部で気泡が発生したり、表面が除去加工され始めた程度である。一方、EFEP は他の 2 種類のフッ素樹脂に比べて除去加工量が多く、矩形形状の止め穴が加工できている。また、EFEP に比べて PFA と FEP は加工面の粗さが悪いことがわかった。そこで、以下の実験では EFEP を用いてマイクロ流路形成の検討を行った。

表 2-4 フッ素樹脂フィルムの主な加工条件

| | |
|---------|--|
| 加工装置 | Exitech 社製エキシマレーザー加工機 PS2000 LAMBDA PHYSIK 社製発振機 LPX200i |
| レーザー波長 | 248 nm , 193 nm |
| 縮小光学系倍率 | 3 0 倍レンズ系 |
| 発振エネルギー | 150 mJ |
| フルエンス | 4.0 J/cm ² , 6.3 J/cm ² , 7 J/cm ² , 8.0 J/cm ² , 12 J/cm ² |
| 発振周波数 | 20 Hz , 100 Hz |
| ビーム形状 | 100 μ m × 100 μ m , φ 17 μ m |

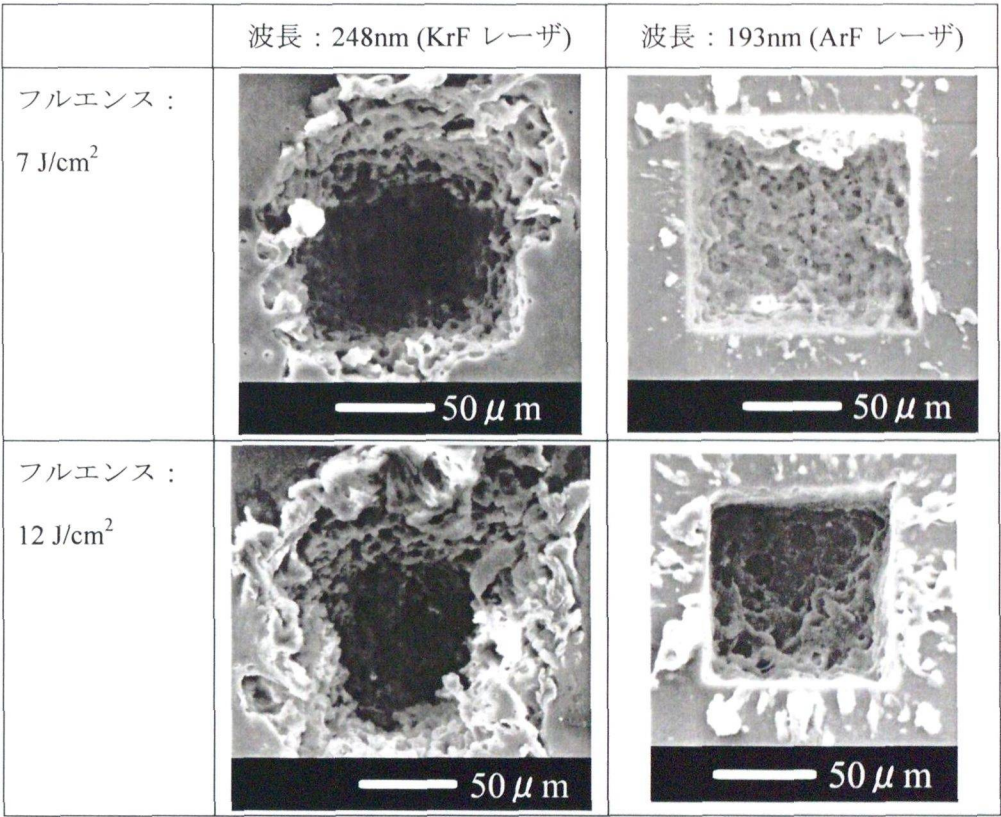


図 2-21 レーザ波長が異なる場合の加工部の S E M 観察写真

表 2-5 C-F 結合の結合エネルギーとエキシマレーザーの光子エネルギー

| | C-F 結合 | KrF レーザ(248nm) | ArF レーザ(193nm) |
|------------|------------|----------------|----------------|
| 結合エネルギー | 538 kJ/mol | 479 kJ/mol | 618 kJ/mol |
| または光子エネルギー | 5.5 eV | 5.0 eV | 6.4 eV |

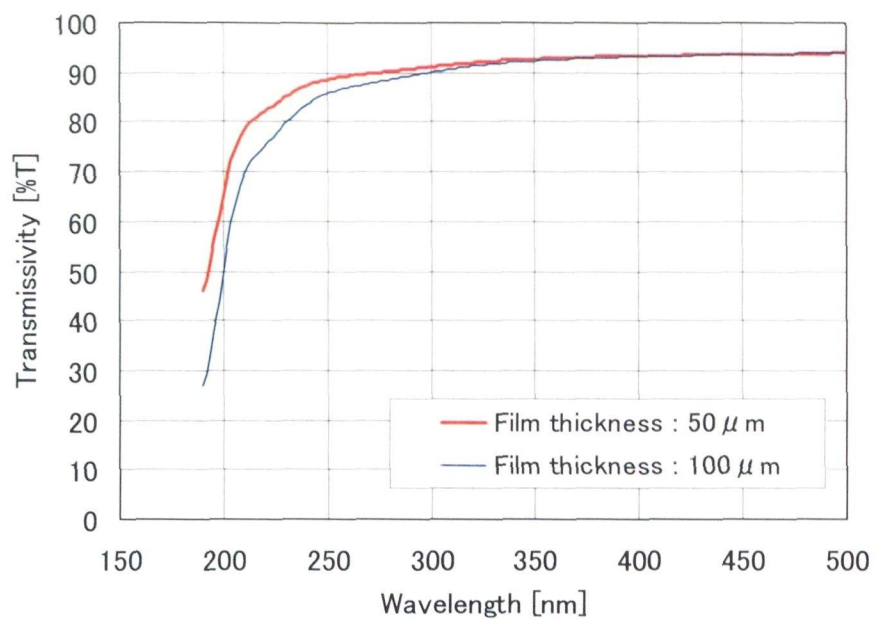


図 2-22 フッ素樹脂 EFEP の透過率

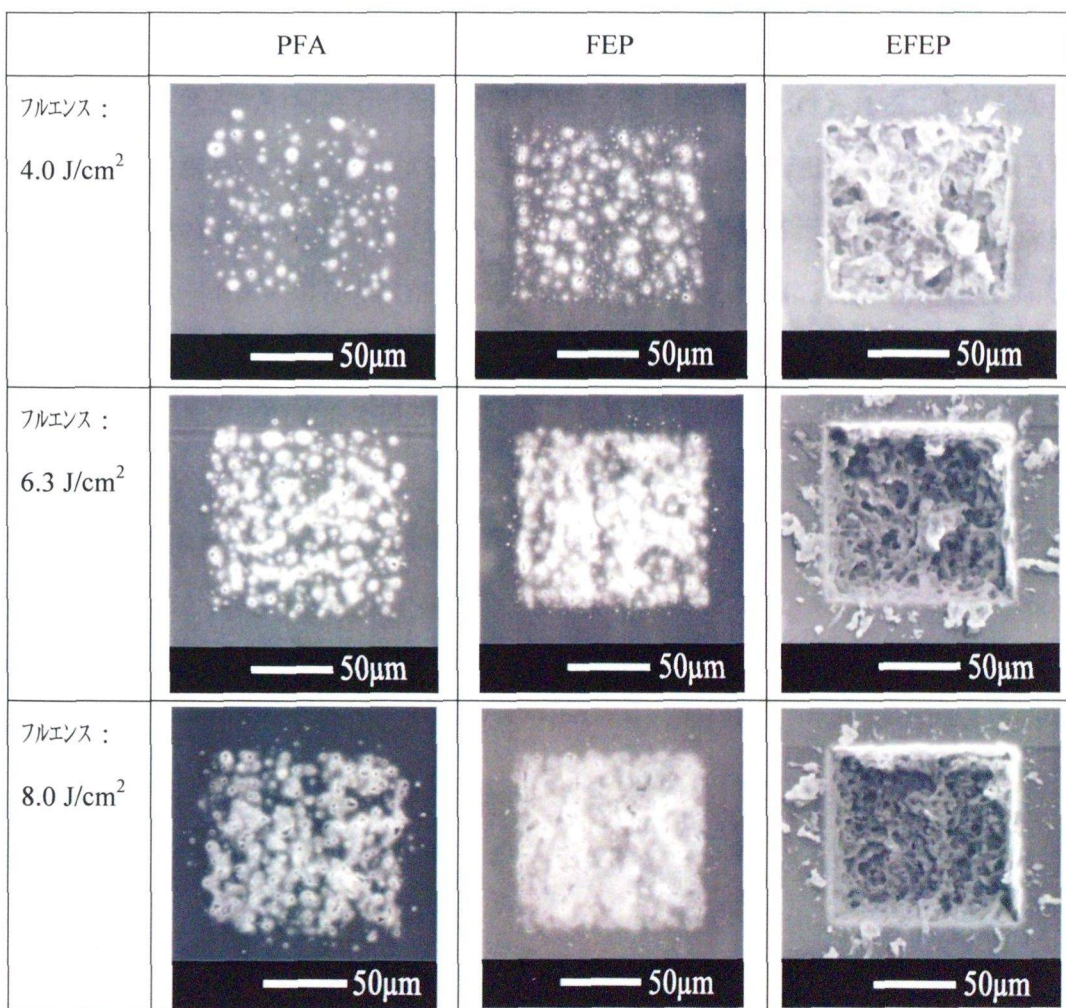


図 2-23 材料が異なる場合の加工部のSEM観察写真

波長 193nm, フルエンス $12.1\text{J}/\text{cm}^2$ のレーザで EFEP に $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ の矩形形状の穴を加工した時のレーザ照射パルス数と加工深さとの関係を調べた結果を図 2-24 に示す. 加工屑の残留の影響はあるが, アスペクト比が 1 前後の穴形状ではレーザ照射パルス数と加工深さとは, ほぼ比例関係であることがわかった. 次に, スキャン加工によって微細溝を加工する場合に, 加工屑の残留を軽減することを目的として, 1 回のスキャンすなわち 1 パスの加工ではレーザ照射回数を少なく設定して浅い溝の加工を行い, その加工を数回スキャンさせる加工, すなわち複数パスの加工を行うことによって深い溝を加工する実験を行った. 図 2-25 は EFEP に波長 193nm, フルエンス $12.1\text{J}/\text{cm}^2$, レーザビーム径 $60\mu\text{m}$, 発振周波数 100Hz のレーザ加工条件で, ステージ送り速度を $40\mu\text{m}/\text{s}$ として 1 回のスキャン (1 パス) で加工した溝と, ステージ送り速度を $120\mu\text{m}/\text{s}$ として 3 回のスキャン (3 パス) に分割して加工した溝の断面観察写真である. 両者とも総照射回数は 2500 pulses/mm であるが, 両者を比較すると, 1 回のスキャン加工では, 溝の断面形状が V 字形状になってしまいが, 複数スキャン加工では溝深さはやや浅いが, 1 回のスキャン加工ごとにほぼ均等に除去加工されるため溝側面の傾きは減少し矩形断面の溝に近づけられることがわかった. 次に, フッ素樹脂を加工した場合の加工屑の残留, 加工底面の面粗さ, 溝側面の傾きが大きいなどの対策の 1 つの方法として, フィルムを貫通させる微細溝加工を試みた. 本研究では樹脂ラミネート法によって流路を形成するため, フィルム上に貫通の微細溝を加工し, その両面からフッ素樹脂フィルムをラミネート接着して溝を覆うことによりマイクロ流路を作製できる. 加工実験結果の例として, 溜池構造をもつ微細溝を加工したサンプルと端部に円筒空間をもつ微細溝を加工したサンプルの光学顕微鏡観察写真を図 2-26 に示す. 形状は, 幅約 $100\mu\text{m}$, 深さ約 $100\mu\text{m}$ の溝の途中に, 幅約 $500\mu\text{m}$ に流れが広がる空間部分をもつ溜池構造と, 幅約 $100\mu\text{m}$, 深さ約 $100\mu\text{m}$ の溝の端部に, 直径約 $500\mu\text{m}$ の注入・注出のための空間部分をもつ構造である. 貫通の加工にすることによって, 比較的良好な加工形状と加工面粗さを有する微細溝が得られた. フィルム表面と溝側面との傾斜を測定した結果は約 81° であり, 側面テーパを 10° 未満に低減することができた.

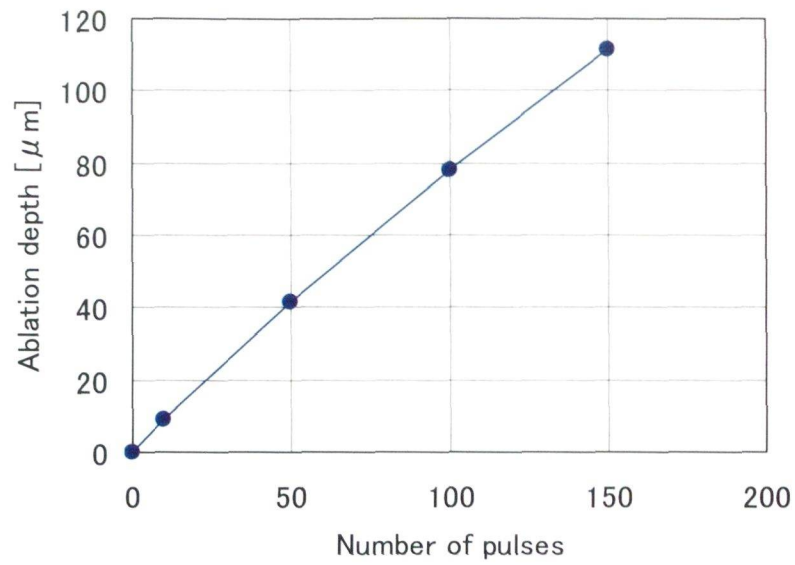
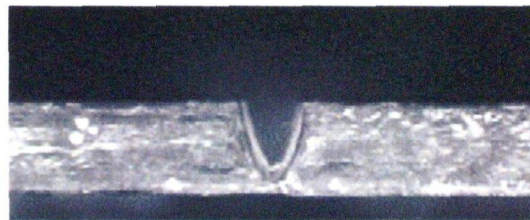
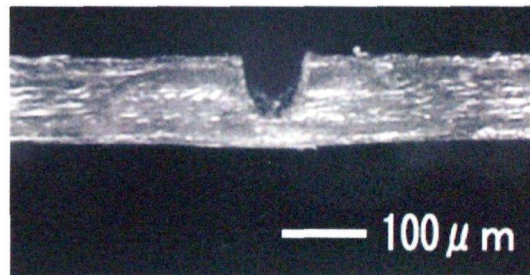


図 2-24 EFEP におけるレーザ照射パルス数と加工深さとの関係



(a) 1回スキャン



(b) 複数回スキャン

図 2-25 スキャン回数による加工溝の断面観察写真

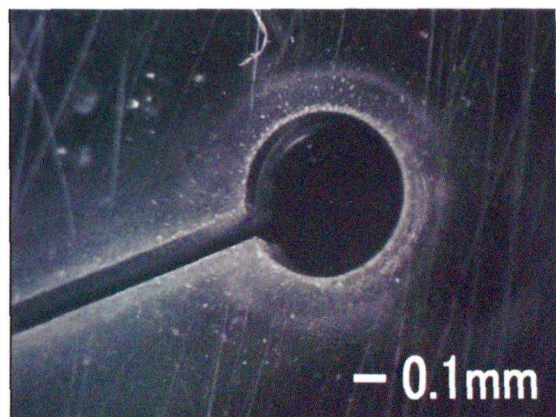
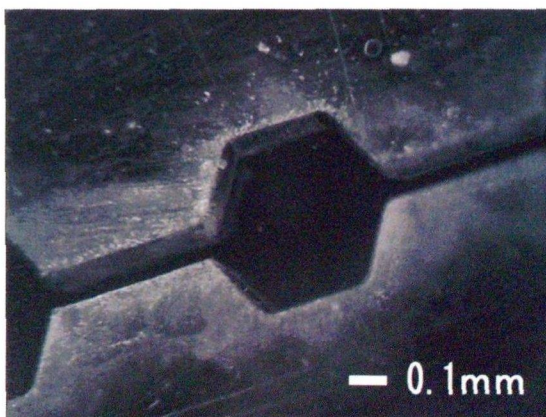


図 2-26 フッ素樹脂への貫通微細溝加工サンプルの光学顕微鏡観察写真

2.4.2 材料温度によるレーザ加工への影響

波長 193nm のレーザによる EFEP への加工においても、フッ素樹脂はポリイミドなどの樹脂材料に比べて除去しにくく、大きなフルエンスを与えても完全なアブレーション加工ができずに加工屑のような状態で穴内部や周辺に堆積する。そこで、材料の温度が加工へ及ぼす影響について調べた。図 2-27 に加熱部の概略図を示す。図 2-28 は波長 193nm、フルエンス 12 J/cm^2 のレーザによる EFEP への加工深さと材料温度との関係を調べた結果である。また、図 2-29 は材料温度が 20°C 、 60°C 、 100°C 、 120°C における加工部の SEM 観察写真である。材料の温度が上昇すると 1 パルス照射あたりの除去量は増加するが、加工面粗さはほとんど変化がなかった。加工面や加工屑の状態から、材料の温度が上昇することによって熱加工による除去量は増加したが、加工面粗さについては改善されなかった。

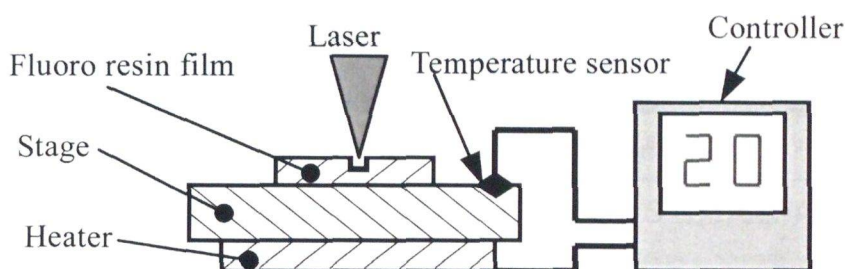


図 2-27 材料温度を変化させたレーザ加工実験に用いた実験装置の概略図

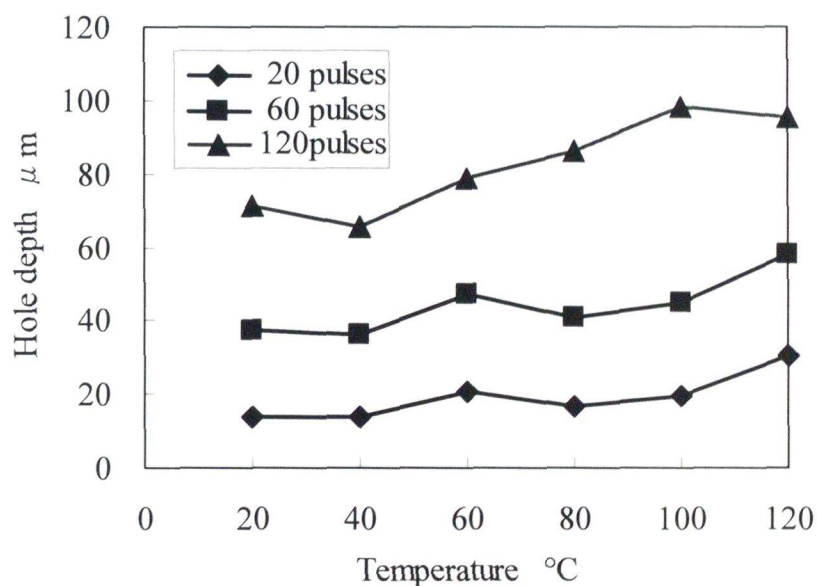


図 2-28 フッ素樹脂 EFEP の材料温度と加工深さとの関係

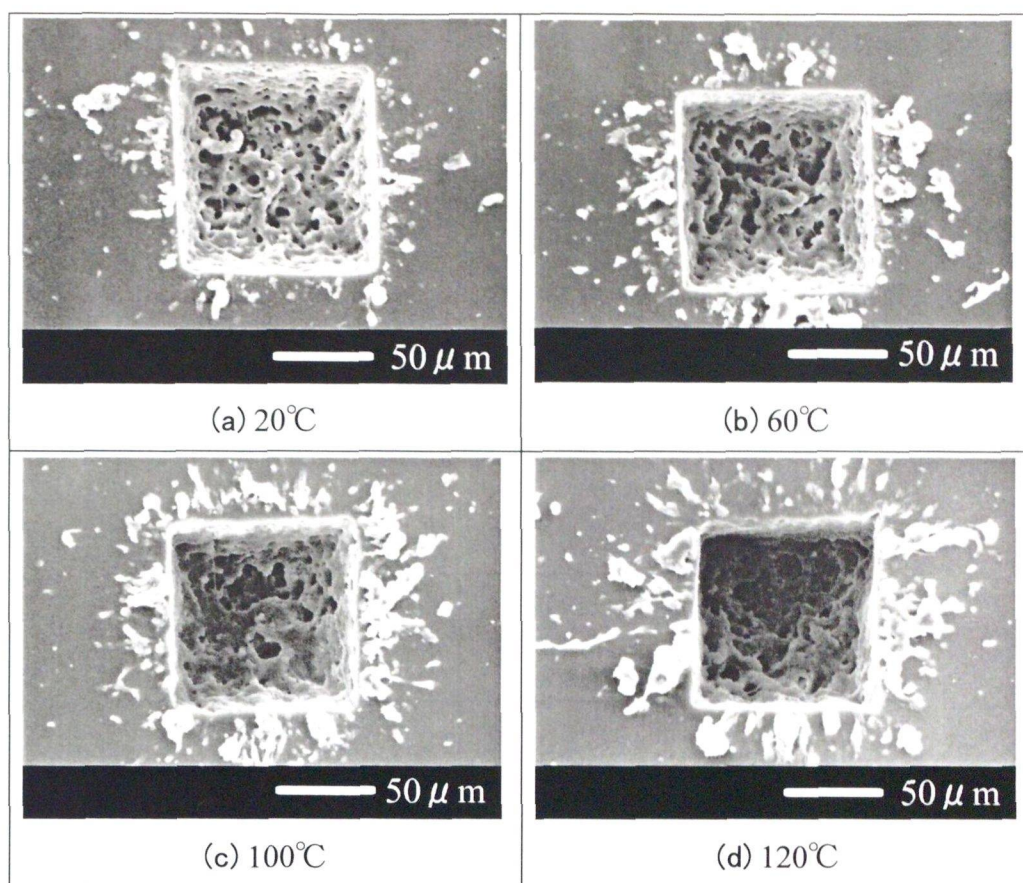


図 2-29 材料温度が異なる場合のレーザ加工部のSEM観察写真

2.4.3 フッ素樹脂加工面の表面平滑化

波長 193nm のレーザによる EFEP への加工においても、フッ素樹脂はポリイミドなどの樹脂材料に比べて除去しにくく、大きなフルエンスを与えても完全なアブレーション加工ができずに加工屑のような状態で穴内部や周辺に堆積する。そこで、レーザ加工穴の表面粗さを改善させることを目的として、穴加工後にレーザのフルエンスを下げた加工条件でさらに加工部の表面を除去加工し平滑化することを試みた。レーザのフルエンスを変化させることによって、加工面粗さへ及ぼす影響について調べた。はじめに、表 2-6 に示す加工条件によってフッ素樹脂フィルム EFEP に $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ で深さが約 $25\mu\text{m}$ の穴を加工した。図 2-30 は加工した穴のSEM観察写真であり、初期の状態では加工面の荒れが大きいことがわかる。次に、表 2-7 に示す加工条件によって、さらに加工部の表面を除去加工した。レーザのフルエンスと照射回数を変化させて、表面の平滑化加工を行った穴のSEM観察写真を図 2-31 に示す。照射回数が 10 パルスではフルエンスを増加させても表面の荒れは変化がない。照射回数が 500 パルスの時はフルエンスを増加させると平滑化され

た．同様に，同じフルエンスであれば照射回数が増加するほど加工表面の荒れは小さくなり平滑化されていった．しかし，フルエンスが 6 J/cm^2 ，照射回数 500 パルスの場合では，加工表面の荒れは非常に小さくなり平滑化されるが，除去加工量も増加して穴が貫通してしまった．したがって，フルエンスが $4 \sim 5 \text{ J/cm}^2$ ，照射回数 500 パルスの条件が平滑化加工には適していると考えられる．また，これら平滑化加工の効果は，最表面や突起状の部分が少しずつ除去されていくことと，熱による最表面や突起状の部分の溶融が原因であると推測される．

表 2-6 レーザ加工の初期条件

| | |
|---------|--|
| フッ素樹脂材料 | EFEP (厚さ : $100 \mu\text{m}$) |
| レーザ波長 | 193 nm |
| ビーム形状 | $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ |
| フルエンス | 8.0 J/cm^2 |
| 照射回数 | 50 pulse |

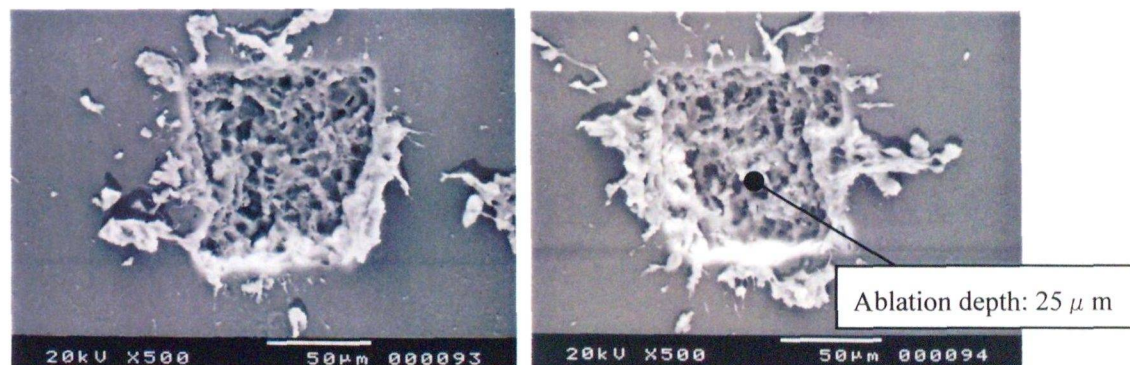


図 2-30 フッ素樹脂へのレーザ加工穴の初期状態

表 2-7 表面平滑化実験のレーザ加工条件

| | |
|---------|--|
| フッ素樹脂材料 | EFEP (厚さ t : $100 \mu\text{m}$) |
| レーザ波長 | 193 nm |
| ビーム形状 | $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ |
| フルエンス | 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 J/cm^2 |
| 照射回数 | 10, 100, 500 pulse |

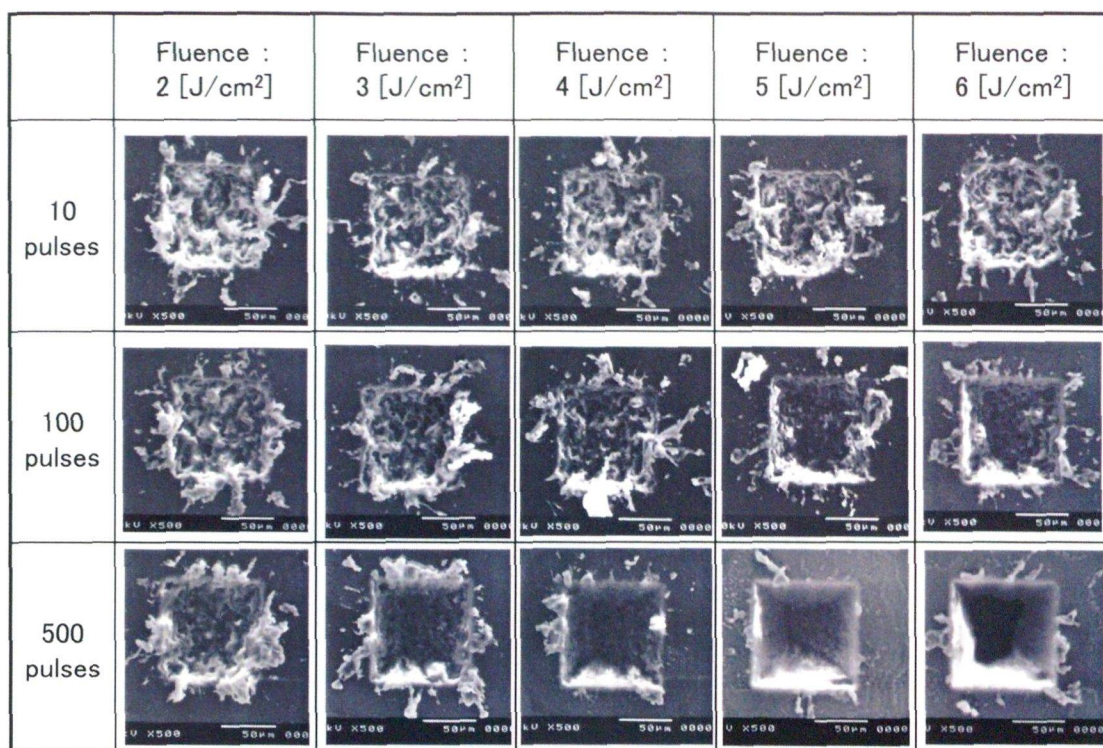


図 2-31 フッ素樹脂 EFEP のレーザ加工穴の表面平滑化実験結果

2.4.4 フッ素樹脂への微小穴加工

フッ素樹脂への溝加工実験の結果（2.4.1 節～2.4.3 節）から、矩形断面流路を形成する層にはフッ素樹脂よりもレーザによる溝加工状態が良好なポリイミドの熱硬化性ラミネートフィルムを使用し、微小穴を加工する層にはフッ素樹脂フィルムを使用することとした。これは、ポリイミドの熱硬化性ラミネートフィルムでは図 2-32 に示すように微小穴加工時に穴出口で亀裂やはがれのようなヒビ等が発生してしまうことや、加工面での血球の付着や詰まりも起こりやすいことなどからである⁹⁻¹⁰⁾、

そこで、レーザによってフッ素樹脂フィルムへ微小穴を加工する条件を検討した。レーザには波長 193nm のエキシマレーザを用い、光学系に円形アパーチャを挿入して、集光によるビームの最小寸法を直径 17 μm とした。はじめに、レーザの照射回数による加工状態への影響を調べた。図 2-33 は、厚さ 100 μm の EFEP フィルムに直径 20 μm の穴を加工し、レーザの照射回数を変化させた場合の加工部の SEM 観察写真である。図 2-33 (a), (b) に示すように穴が貫通するまでは加工面粗さは悪いが、穴が貫通した後にレーザ照射回数をさらに増加させることによって、図 2-33 (d) に示すように、穴側面の加工面荒れが低減

された。これは、穴側面が少しずつ除去されていくことと、熱による加工表面の溶融が影響していると考えられる。また、流路壁面の凹凸によって赤血球の変形や損傷などがないように、流路表面の凹凸は赤血球の直径の 1/10 以下にすることを目標とした。赤血球の直径は約 $8\mu\text{m}$ である。また、図 2-33 (d)では穴周辺に数 μm の除去物の付着があるが、3 章に記述した血液送液実験を行った結果では付着物の影響は特にみられなかった。

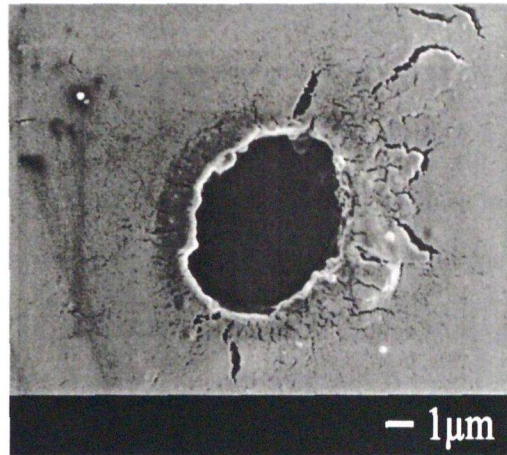


図 2-32 熱硬化性ラミネートフィルムへ加工した微小穴（レーザ出射側から観察）

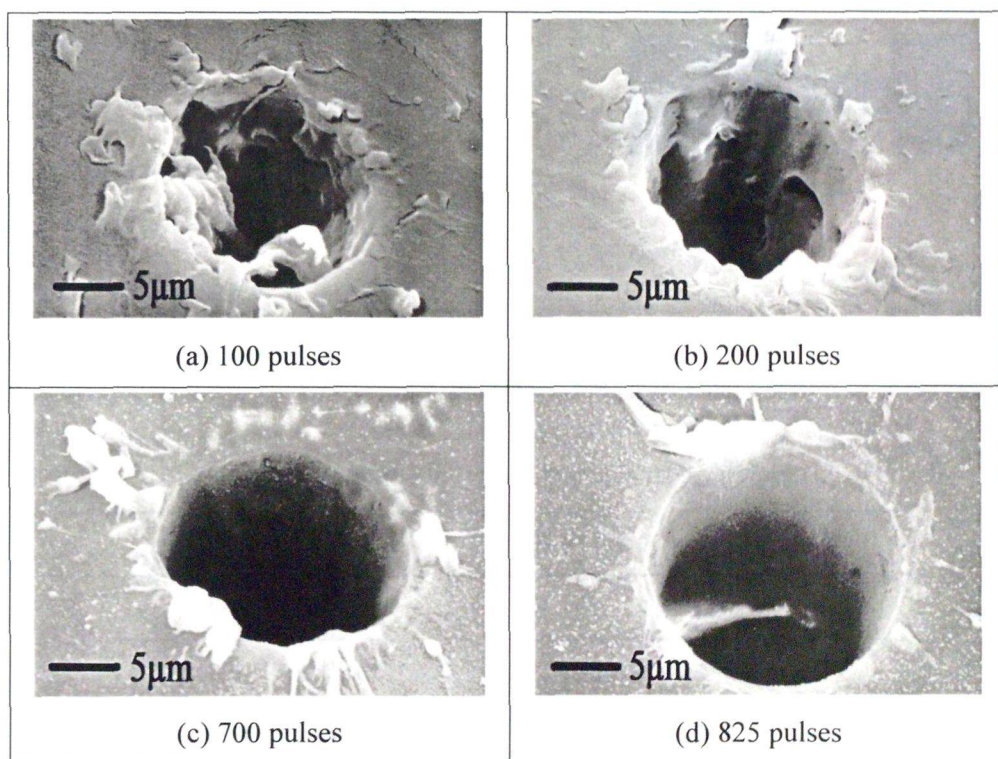


図 2-33 レーザ照射パルス数と加工状態との関係

2.4.5 フーリエ変換赤外分光法による評価

フッ素樹脂は撥水性、耐薬品性、光透過性に優れているが、反面この特性によって接着強度が低いなどの課題もあるため、紫外光をフッ素樹脂表面に照射することによって表面改質させ、親水性を向上させる表面改質技術の研究が報告されている¹¹⁾。一方、 μ TASを医療分野へ適用する場合には、撥水性、耐薬品性、光透過性は重要である。そこで、エキシマレーザによってフッ素樹脂フィルムに加工した面の特性を調べることを目的として、日本分光製のフーリエ変換顕微赤外分光光度計を用いて FTIR（フーリエ変換赤外分光法）による加工部の評価を行った。表 2-8 に示すレーザ加工条件で、図 2-34 に示すように波長 193nm のレーザによって最小厚さ $30\mu\text{m}$ 程度までフッ素樹脂フィルム EFEP を両面から加工した。さらに両面加工した EFEP の加工部分のみを約 $300\mu\text{m}\times 300\mu\text{m}$ に切断してレーザ加工面評価用サンプルを作製した。作製したサンプルの写真を図 2-35 に示す。図 2-36 は EFEP のフィルムを FTIR 分析における透過法によって測定した結果であり、(a) は未加工のフィルム、(b) は波長 193nm のレーザで加工したサンプルについて測定を行った結果である。未加工部およびレーザ加工部の測定結果ともに、C-F 結合や C-H 結合と考えられるピークが現れている。加工時にフィルム内部で気泡が発生するような加工状態から考えて、樹脂表面だけではなく樹脂内部でのレーザの吸収もあると判断されるが、分析結果を比較すると透過スペクトルに大きな違いはなく、レーザ加工による改質はほとんどないと考えられる。

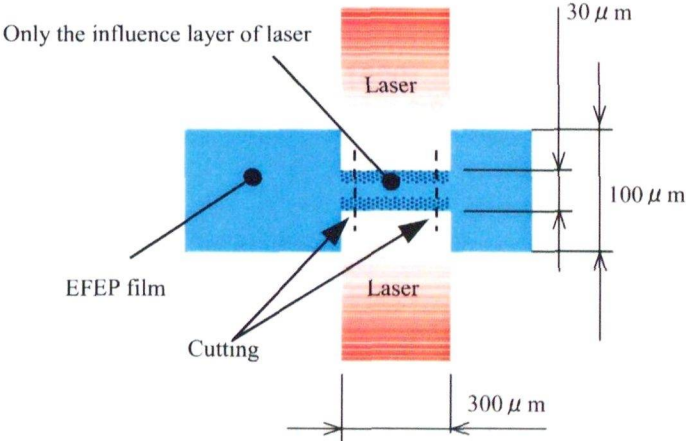
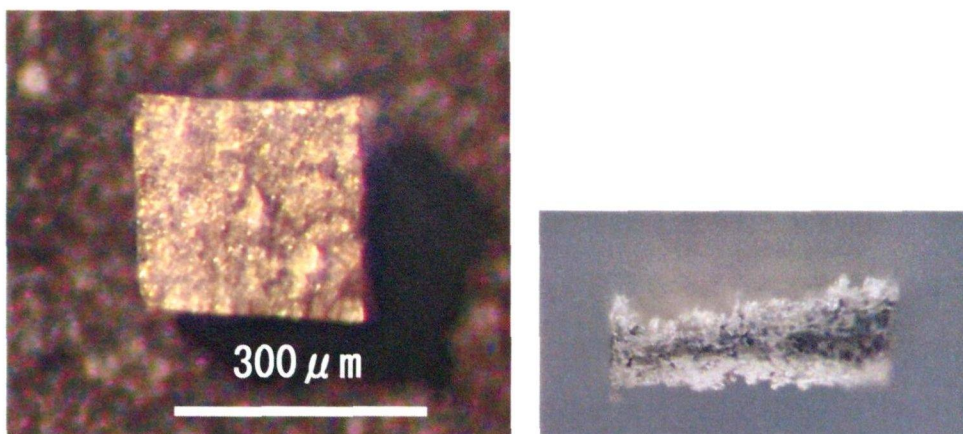


図 2-34 レーザ加工面評価用サンプル作製の概念図

表 2-8 評価用サンプル作製のレーザ加工条件

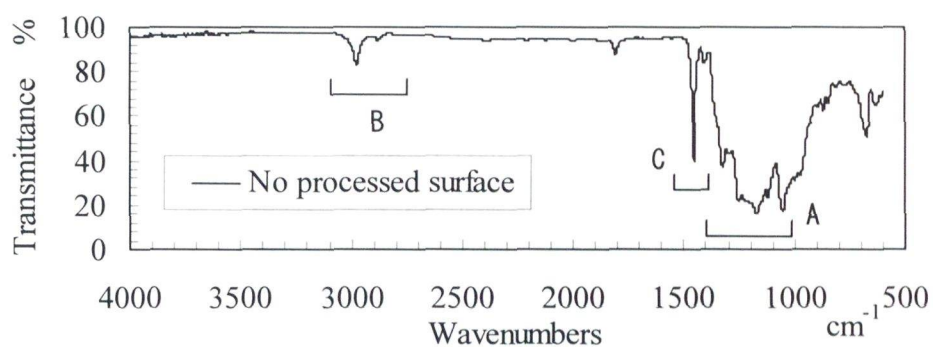
| フッ素樹脂材料 | EFEP（厚さ $t : 100\mu\text{m}$ ） |
|---------|---------------------------------------|
| レーザ波長 | 193 nm |
| ビーム形状 | $300\mu\text{m}\times 300\mu\text{m}$ |
| フルエンス | 8.0 J/cm^2 |
| 照射回数 | 75 pulse |



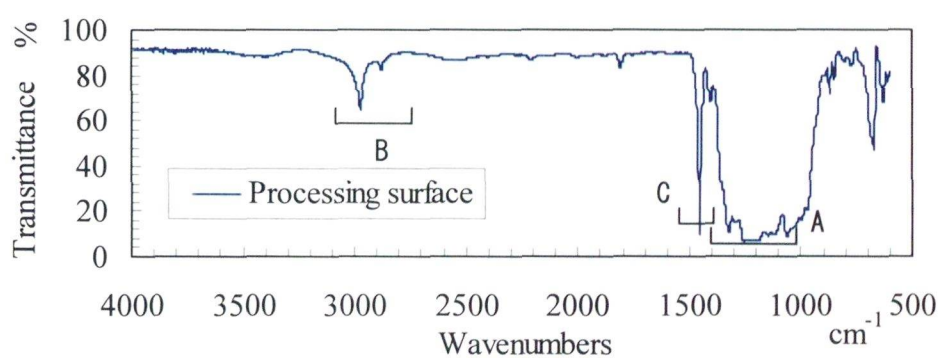
(a) 上面からの観察写真

(b) 側面からの観察写真

図 2-35 両面加工した EFEP を加工部分のみ切り出したレーザ加工面評価用サンプル



(a) 未加工面



(b) レーザ加工面

A : C-F stretching vibration , 1400-1000 cm^{-1}

B : C-H stretching vibration , 3100-2750 cm^{-1}

C : CH_2 - deformation vibration , 1500-1350 cm^{-1}

図 2-36 FTIR によるフッ素樹脂フィルム (EFEP) の測定結果

2.4.6 濡れ性試験による評価

マイクロ流体デバイスの作製ではレーザ加工部分をマイクロ流路に応用することから、加工面の濡れ性が重要である。そこで、エキシマレーザによって加工した面の特性を調べることを目的として、濡れ性試験によるレーザ加工面の評価を行った。未加工面とレーザ加工面との濡れ性を比較する時に、加工面の表面粗さの影響も考えられるため、ここでは動的接触角について測定を行った¹²⁾。図 2-37 に示すように、液滴が膨張する時の接触角である前進接触角と液滴が収縮する時の接触角である後退接触角を測定した。液体は純水を使用し、水滴の液量は $3\mu\text{L}$ 以下、液量の変化率は $1.5\mu\text{L}/\text{min}$ とした。表 2-9 にフッ素樹脂フィルム EFEP の未加工面とレーザ加工面に対する測定結果を示す。EFEP の未加工面とレーザ加工面との動的接触角を比較すると、表面粗さの影響と考えられる僅かな差があるだけで、濡れ性に大きな違いはみられなかった。

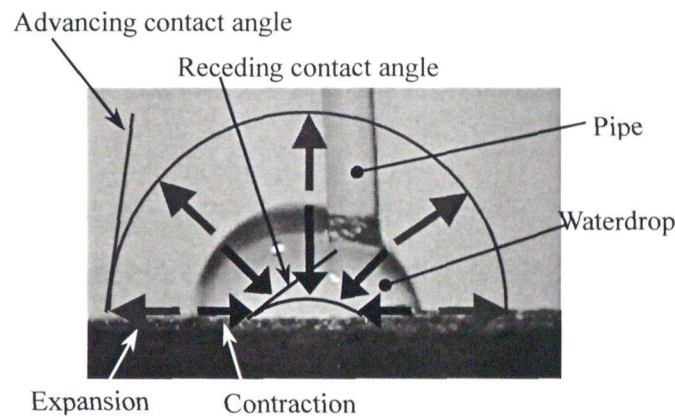


図 2-37 濡れ性試験の概念図

表 2-9 濡れ性試験による動的接触角の測定結果

| Material | Advancing contact angle | Receding contact angle |
|------------------------------|-------------------------|------------------------|
| EFEP No processed surface | 85° | 15° |
| EFEP Processed surface | 87° | 21° |

2.5 マイクロ流路の作製方法

2.5.1 レーザ加工と樹脂ラミネート法によるマイクロ流体デバイス作製プロセス

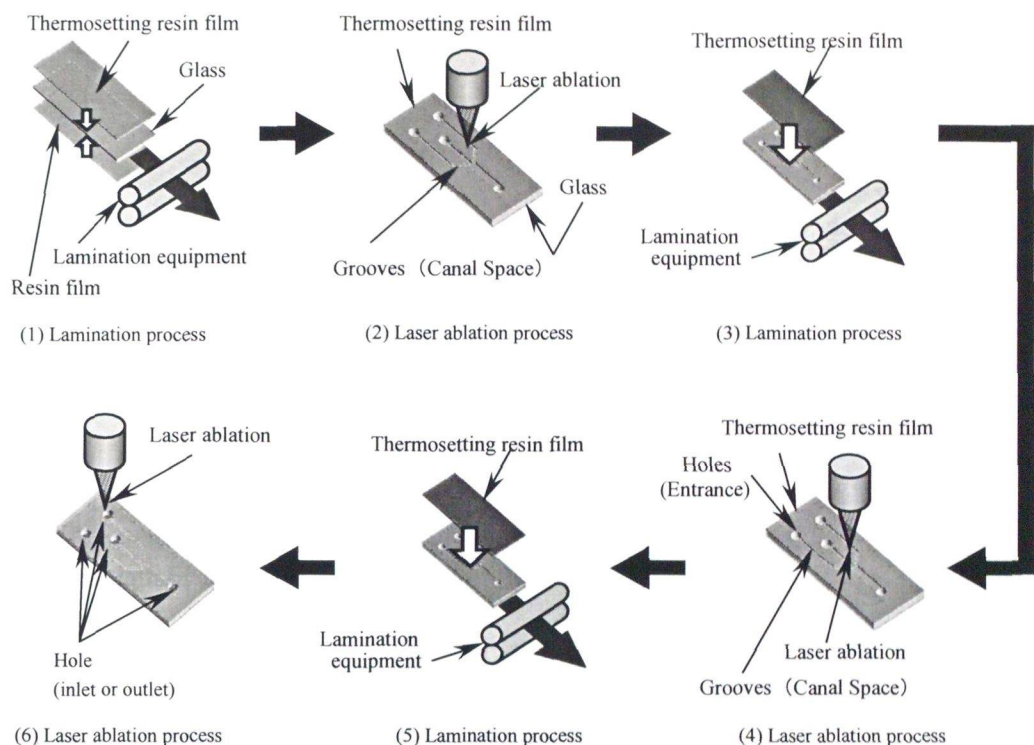
前節までに熱硬化性ラミネートフィルムやフッ素樹脂フィルムに対するレーザ加工技術について検討を行い、流路としての適合性が得られた。そこで、このマイクロ加工技術をもとに、レーザ加工と樹脂ラミネート法を用いたマイクロ流路作製技術の最適化について検討した。図 2-38 にレーザ加工と樹脂ラミネート法によるマイクロ流路の作製プロセスを示す。ラミネート接着に使用したラミネータは、一般的な事務機器であるコクヨ(株)製パウチ KLM-HA110 および KLM-HA230 を用いた。このラミネータはホットシューによる加熱方式であり、接着温度はおよそ 120℃である。パウチ速度は 330mm/min または 430mm/min である。本研究では、2種類の樹脂フィルムを使用して、2つのマイクロ流体デバイス作製方法について検討した。1つは、ポリイミドの熱硬化性ラミネートフィルムのみを使用し矩形断面流路をもつマイクロ流体デバイス作製方法である。もう1つは、2.4.4 節で述べたように、矩形断面流路を形成する層にはポリイミドの熱硬化性ラミネートフィルムを適用し、一方、微小穴を加工する層にはフッ素樹脂フィルムを適用するマイクロ流体デバイス作製方法である。

図 2-38(a)は熱硬化性ラミネートフィルムの積層によるマイクロ流体デバイスの作製プロセスである。はじめに基板となるカバーガラスをポリイミドの熱硬化性ラミネートフィルムと透明な樹脂ラミネートフィルムとで挟み、ラミネート接着し(図 2-38. (a)-(1))、レーザ加工によって樹脂部分に微細溝や穴を形成する(図 2-38. (a)-(2))。多層化させる場合は、さらに樹脂フィルムをラミネート接着し(図 2-38. (a)-(3))、レーザ加工によって微細溝や穴を形成することにより多層化させ立体流路を形成する(図 2-38. (a)-(4))。最後に樹脂フィルムをラミネート接着して覆うことによってマイクロ流路を形成し(図 2-38. (a)-(5))、レーザ加工によって試料の注入や注出のための穴を形成する(図 2-38. (a)-(6))。

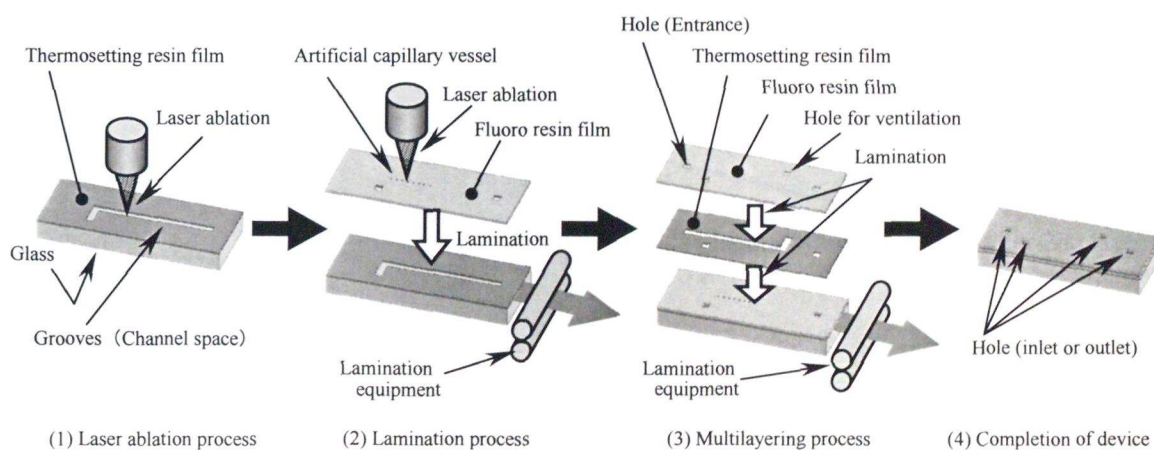
図 2-38(b)はフッ素樹脂フィルムと熱硬化性ラミネートフィルムとの積層によるマイクロ流体デバイスの作製プロセスである。はじめに基板となるカバーガラスをポリイミドの熱硬化性ラミネートフィルムと透明な樹脂ラミネートフィルムとで挟みラミネート接着し、レーザ加工によって樹脂部分に矩形断面流路となる微細溝を形成する(図 2-38. (b)-(1))。次に、あらかじめレーザにより微小穴(毛細血管流路)などの微細加工を行ったフッ素樹脂フィルムをラミネート接着する(図 2-38. (b)-(2))。さらに、レーザ加工により矩形断面流路などを加工した熱硬化性ラミネートフィルムや、出入口の穴を加工したフッ素樹脂フィ

ルムをラミネート接着により積層化させ、立体流路を形成する（図 2-38. (b)-(3)）。さらに多層化させる場合はこのプロセスを繰り返し、マイクロ流体デバイスを完成させる（図 2-38. (b)-(4)）。

また、本プロセスでは樹脂フィルムをラミネート接着で積層化させる時に、パイプなどのマイクロ部品を挿入することによって、マイクロ部品を内蔵した立体流路を形成することが可能となった。



(a) 熱硬化性樹脂フィルムの積層



(b) フッ素樹脂フィルムと熱硬化性樹脂フィルムとの積層

図 2-38 積層による 3 次元流路をもつマイクロ流体デバイスの作製プロセス

2.5.2 マイクロ流路の作製

樹脂ラミネート法によるマイクロ流路の作製プロセスでは、薄い樹脂フィルムに対して加熱・加圧によって接着を行うため、この熱や圧力による流路空間の形状変化などについて調べた。

図 2-39 はポリイミドの熱硬化性ラミネートフィルムを積層化させて作製した矩形断面流路の観察写真である。流路断面形状は $50\mu\text{m} \times 45\mu\text{m}$ であり、熱硬化性樹脂を用いることによって流路壁面が変形することなく流路となるマイクロ空間が形成できていることがわかる。

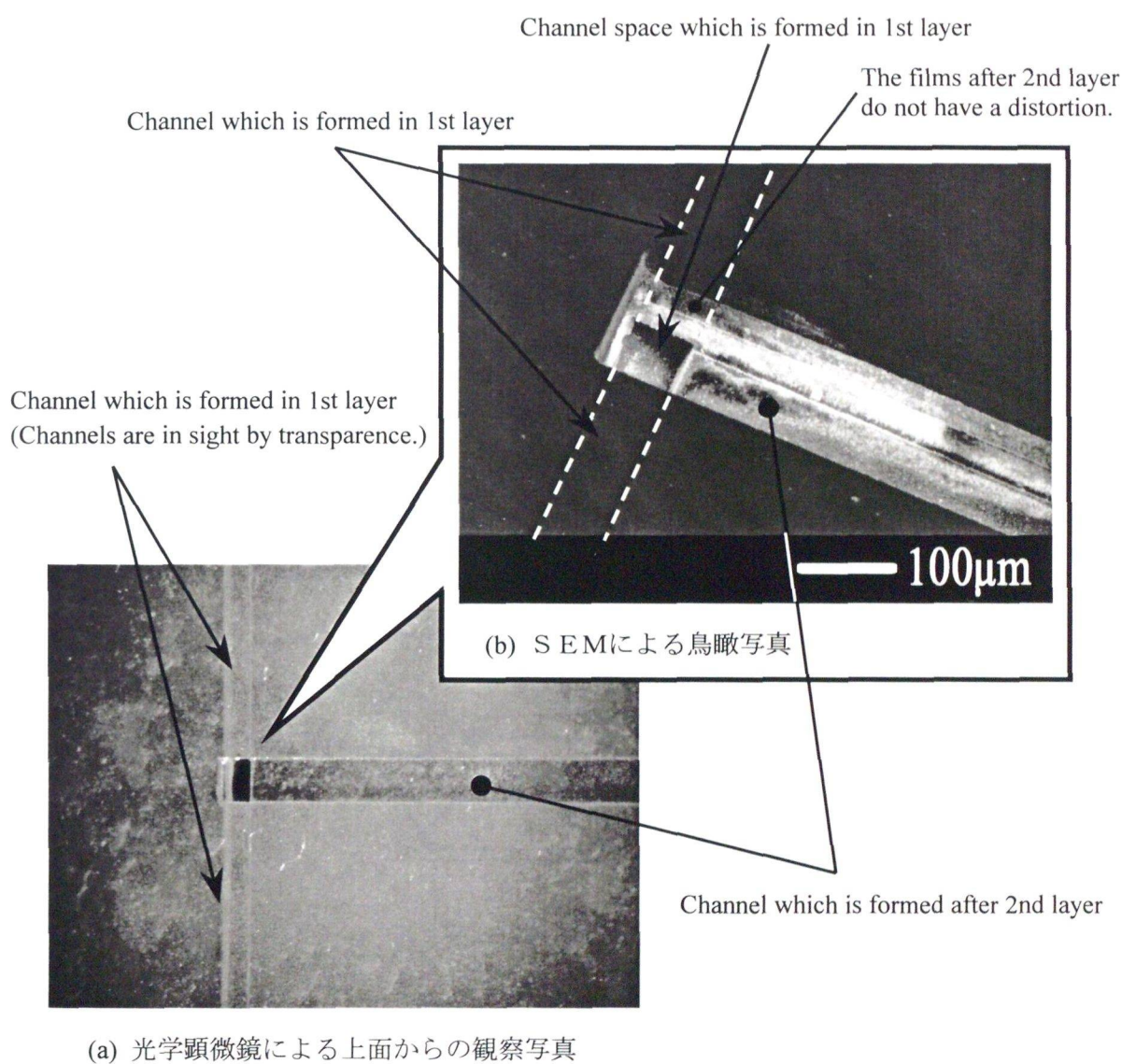


図 2-39 熱硬化性ラミネートフィルムを積層したマイクロ流路の観察写真

一方、フッ素樹脂フィルムは熱可塑性樹脂であるため、2.2 節の図 2-5 に示す流路の断面図のように、ラミネートの際に熱と圧力により流路が潰れてしまう可能性がある。さらに、本研究では接着強度を増加させるために、ラミネート接着後に 130℃の炉内に 1 時間放置させているので、軟化による変形の可能性もある。そこで、作製条件とマイクロ流路の変形との関係について検討した。図 2-40 の概略図に示すように厚さ 100 μm のフッ素樹脂フィルム EFEP を積層化させて矩形断面流路を作製し、この断面を観察した写真を図 2-41 に示す。図 2-41(a)は流路断面形状が幅 200 μm \times 深 100 μm であり、フィルム厚さに対して溝幅が広い場合には、流路の天井と底面を形成している上下のフィルムが変形してしまうことがわかる。一方、図 2-41(b)は流路断面形状が幅 100 μm \times 深 100 μm であり、フィルム厚さと溝幅が同じ場合には、流路の天井と底面を形成している上下のフィルムの変形は観察されない。正確な評価のために、輪郭表面形状測定機を使用して流路の天井を形成するフィルム上面の輪郭形状を測定した。ラミネート接着後における測定結果を図 2-42 に示す。流路の天井を形成するフィルムの変形は 1.96 μm で流路の潰れは僅かであった。また、130℃の炉内放置後における測定結果を図 2-43 に示す。流路の天井を形成するフィルムの変形は 1.78 μm であり、炉内放置前と比較すると測定誤差内の変化程度であり、炉内温度 130℃の場合は流路の潰れに対する炉内放置の影響はほとんどないと考えられる。

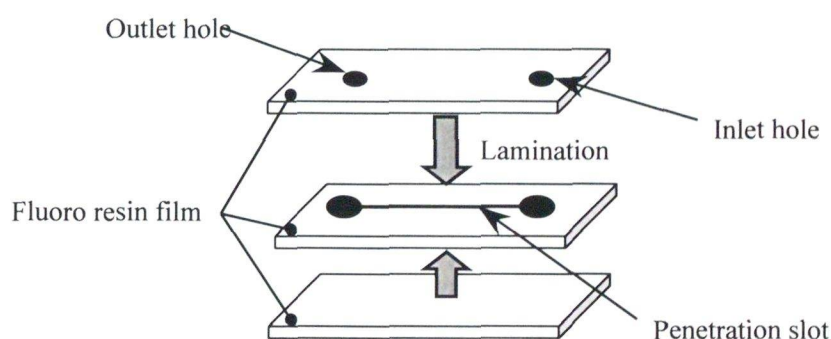
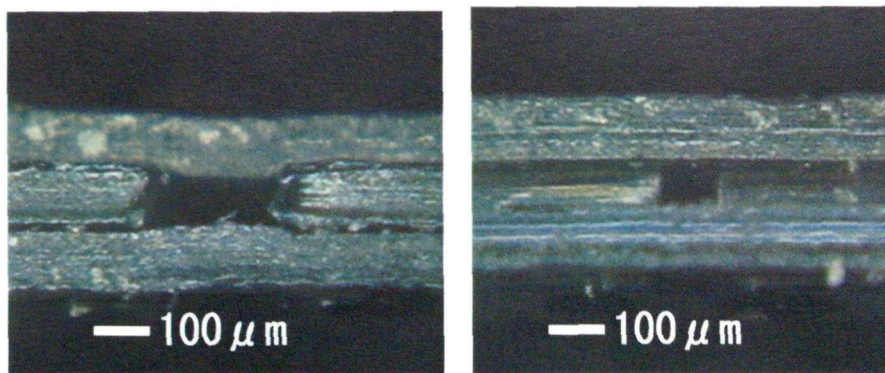


図 2-40 フッ素樹脂フィルムを積層させた概略図



(a) 溝幅が大きい場合

(b) 溝幅が小さい場合

図 2-41 フッ素樹脂フィルムを積層した端面(流路断面)の観察写真

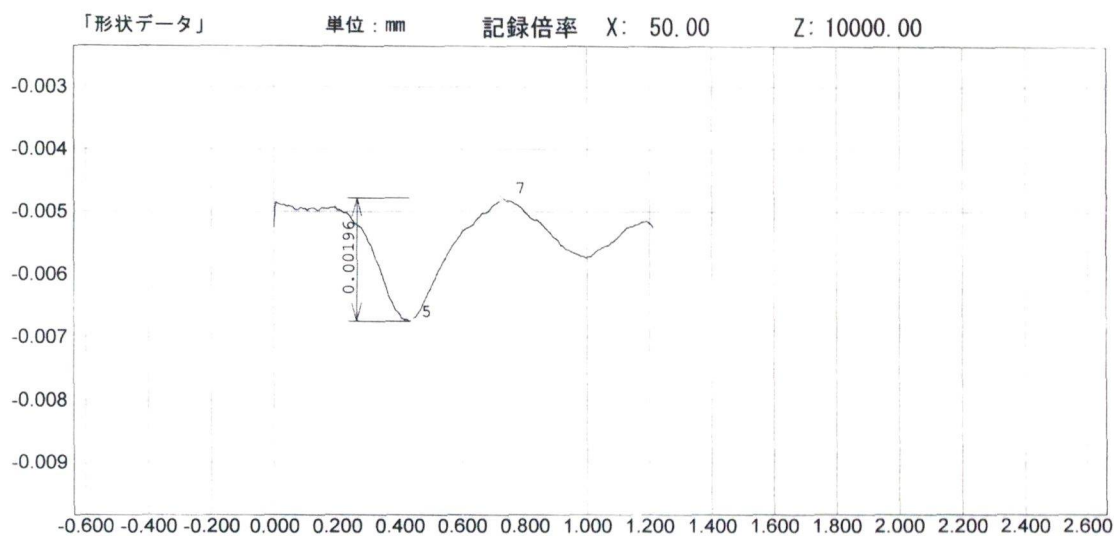


図 2-42 流路の天井を形成するフィルム上面の輪郭形状測定結果

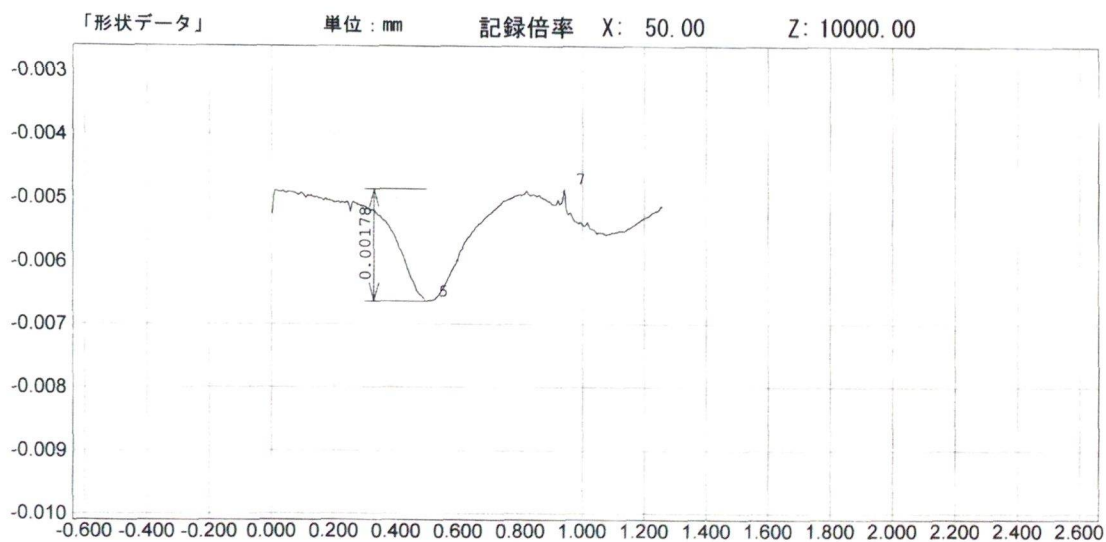


図 2-43 炉内放置後における流路の天井を形成するフィルム上面の輪郭形状測定結果

2.6 結言

μ T A S の作製には、流路や溜池などを形成するための微細溝や微小穴を加工し、さらにこれらをもとにマイクロ流路を作製する必要がある。そこで、本研究では、流路作製時における熱や圧力に対して流路の潰れを防止し強度も高い素材としてポリイミドの熱硬化性ラミネートフィルムに注目した。また、血液などの生体物質を対象とするため、撥水性や耐薬品性、光透過性に優れたフッ素樹脂に注目した。そして、これらの材料に対して紫外線レーザーによるマイクロ加工技術の検討を行った。さらにこのマイクロ加工技術をもとに、レーザー加工と樹脂ラミネート法を用いたマイクロ流路作製技術の最適化を行った。結果は以下のとおりである。

①レーザーによる熱硬化性ラミネートフィルムへのマイクロ加工技術

- ・フルエンスと加工深さとの関係や、レーザー照射パルス数と加工深さとの関係など、熱硬化性ラミネートフィルムに対するエキシマレーザー加工条件についての最適化を行った。レーザー照射パルス数を制御することによって必要に応じた溝深さを作製でき、また側面テーパを約 7.8° にすることができた。
- ・微細溝や微小穴の加工形状の最適化や、流路壁面となる加工面の面粗さ低減を図ることができた。
- ・マイクロ流路となる微小空間を形成するための微細溝の加工を試みた。三叉構造の微細溝、幅が変化する微細溝、深さが変化する微細溝などが形成でき、比較的良好な加工形状と加工面粗さの微細溝が得られた。

②レーザーによるフッ素樹脂へのマイクロ加工技術

- ・矩形形状の止め穴加工を行い、レーザーの波長、フッ素樹脂材料の種類などの加工条件について検討を行った。波長 248nm に比べて波長 193nm のレーザーの方が、加工形状のコントロールが容易であった。
- ・3種類のフッ素樹脂材料を比較した結果、PFA と FEP では流路を形成することが難しく、EFEP は流路の形成が可能であった。
- ・EFEP では加工屑の残留の影響はあるが、アスペクト比が 1 前後の穴形状ではレーザー照射パルス数と加工深さとは、ほぼ比例関係が得られた。
- ・複数回のスキャン加工にすることによって、溝側面の傾きが減少して矩形断面の溝に近づけることができた。

- ・加工屑の残留，加工底面の面粗さ，溝側面の傾きが大きいなどの対策の1つの方法として，フィルムを貫通させる微細溝加工によって，比較的良好な加工形状と加工面粗さを有する微細溝が得られた。
- ・材料の温度が加工へ及ぼす影響について調べた。その結果，材料の温度による加工面粗さへの影響は少ないことがわかった。
- ・フルエンスが $4\sim 5\text{ J/cm}^2$ ，照射回数 500 pulses の条件が，加工した穴の表面粗さを低減させる平滑化加工には適していることがわかり，比較的なめらかな加工表面が得られた。
- ・微小径の穴加工では，穴が貫通するまでは加工面粗さは悪いが，穴が貫通した後のレーザ照射回数を増加させることにより，穴側面が少しずつ除去されていき，穴側面の加工面荒れが小さくなることがわかった。
- ・レーザ加工面の評価を行った結果，FTIR による測定および濡れ性試験では，加工後の特性変化はほとんどなかった。

③マイクロ流路の作製

- ・熱硬化性ラミネートフィルムの積層によるマイクロ流体デバイスの作製プロセスと，フッ素樹脂フィルムと熱硬化性ラミネートフィルムとの積層によるマイクロ流体デバイスの作製プロセスを考案した。
- ・熱硬化性樹脂を用いることによって流路壁面が変形することなく流路となるマイクロ空間を形成することができた。
- ・フッ素樹脂フィルムは熱可塑性樹脂であるが，樹脂ラミネート法において，フィルム厚さと溝幅を同一寸法の $100\text{ }\mu\text{m}$ にすることによって，流路の天井と底面を形成している上下のフィルムの変形を $2\text{ }\mu\text{m}$ 以下にすることができた。

以上のように，エキシマレーザによる樹脂フィルムへのマイクロ加工技術の最適化，およびレーザ加工と樹脂ラミネート法を用いたマイクロ流路作製技術の最適化を図った。これによって，用途に応じた複数の材料で形成される3次元立体流路をもつマイクロ流体デバイスの作製技術を新たに開発した。さらに，従来は加工が困難であったフッ素樹脂フィルムへの微細溝や微小穴の高精度加工を実現し，フッ素樹脂の特性を有したマイクロ流路を作製可能であることを示した。

参考文献

- 1) 安永暢男: レーザが変える加工技術, (海文堂出版, 1992), pp.42-147
- 2) 宮崎俊行 他共著: レーザ加工技術, (産業図書株, 1998), pp.19-20
- 3) 丸山茂夫 他: マイクロ・ナノ熱流体ハンドブック, ((株)エヌティーエス, 2006), pp.5-15
- 4) G. H. Monhamed et al.: The MEMS Hand-book, (CRC PRESS, 2002)
- 5) 森重幸雄, B. HABA, 岸田俊二: レーザー研究, **22** (11), 886 (1994)
- 6) 杉岡幸次, 和田智之, 田代英夫, 豊田浩一: レーザー研究, **25** (4), 283 (1997)
- 7) 三島英彦, 増田泰人, 奥田泰弘, 橋田昌樹, 清水政二, 阪部周二: 光・量子デバイス研究会資料(電気学会), **OQD-05**, 23 (2005)
- 8) ダイキン工業(株)ホームページ: <http://www.daikin.co.jp/chm/pro/fluoro/efep/index.html>
- 9) R. Tahara, T. Neichi, Y. Yoshida and N. Terada: *Proc. Int. Conf. Electrical Engineering 2004*, (Sapporo, 2004), PO2-128 (2004)
- 10) 田原烈, 山田潤, 吉田善一, 寺田信幸, 山田博之: 2005年度精密工学会春季大会学術講演論文集, 573 (2005)
- 11) 村原正隆: ポリファイル, **34** (2), 55 (1997)
- 12) 水町浩, 鳥羽山満 監修: 表面処理技術ハンドブック, ((株)エヌティーエス, 2000), pp.66-70

第3章 血液検査用マイクロ流体デバイスの作製

3.1 緒言

現在行われている血液検査には、血球計測、変形能測定、形成時間測定、凝固時間測定などがある。血球計測は血液中の血球数やリンパ球数を把握することであり、多血症、血液濃縮、貧血、白血病などの診断に不可欠である。また、変形能測定は赤血球の物理的・化学的性状変化を把握することであり、糖尿病、心筋梗塞、脳血管障害の予防や治療に不可欠である。血液検査機器の1つに、細胞、バクテリア、微粒子の同定やカウントなどの定量測定を行うフローサイトメーターがある。しかし、従来のフローサイトメーターは大型で高価な機器であるため、自宅やケアハウスなどで気軽に検査ができる小型のフローサイトメーターが開発されつつある。そこで本研究では、カードサイズに小型・集積化したマイクロフローサイトメーターをはじめとする血液検査用 μ T A S の作製を目標とした。2章では、エキシマレーザによる樹脂フィルムへのマイクロ加工技術の最適化、およびレーザ加工と樹脂ラミネート法を用いたマイクロ流路作製技術の最適化を図った。次に、これらの技術をもとに血液検査用マイクロ流体デバイスを作製し、これらのマイクロ流路について血液検査用 μ T A S への応用の可能性を検討した。

血液検査において血球の同定やカウントなどの定量測定を行うためには、血球を並べて流すことが有効であると考えられる。血球の大きさよりも僅かに大きな流路断面寸法のマイクロ流路であれば、血球が並列して流れず、一列に流れると考えられる。しかし、血液は粘性の高いコロイド状の流体でタンパク質などを含むため、幅が数 μ m のマイクロ流路に血液を流すと直ちに閉塞する可能性が考えられる。また、数 μ m の微細流路を精度良く、かつ面粗さも良好な状態で加工を行うことは容易ではない。一方、流れが層流から乱流に移行する臨界レイノルズ数は円管の中の定常流で約 2000 である。成人胸部の大動脈の直径はおよそ 20~27mm であり、最も細い毛細血管の直径はおよそ 5 μ m であり、血管内を流れる血液のレイノルズ数は約 10000~0.001 である。したがって、血液は内径が 1 mm 程度の小動脈よりも細い血管では層流になる。そこで本章では、試料がシース液に包まれた状態で流れるシースフロー現象を応用し、流体の圧力を制御することによって、血液の流れ幅を絞り血球を整列させることを試みたので報告する。

また、現在いくつかの研究グループがマイクロフローサイトメーター、マイクロセルソーター、マイクロセルカウンターをはじめとする血液検査用 μ T A S を開発している¹⁻¹³⁾。

しかし、液体試料を流す方法は十分に確立されていない。本研究ではマイクロ流体デバイスに取り付けられた接続チューブ内の液体のポテンシャルエネルギーによって液体試料を流路内に流すことを見出した。さらに、接続チューブを使用せずにチップを垂直な状態にすることによって、マイクロ流路内の液体に加わる重力を利用して液体を駆動する方法を提案した。 μ TASとして用いる分析チップは非常に小さいが、一般的にポンプや接続チューブのように周辺装置は非常に大型であった。そこで、本研究ではポンプや電気泳動力などを使用せずに、流路内の液体を送液する方法として、重力を利用した駆動方法を開発した。この方法によって、ポンプユニットをマイクロ流体デバイス内に集積することができ、また非常に微量な液体試料で送液できる。

近年、流体に関する設計においてコンピュータシミュレーション(CAE: Computer Aided Engineering, 以下はCAEと記述する)すなわち数値計算による流体解析が、様々な流れ場の予測や流体に関する設計に活用されては始めている。しかし、マクロスケールの流れ場では十分に小さく無視できた壁面の表面粗さや流体の粘性などの要因が相対的に大きくなるなどの特徴があり、従来の流体モデルでは誤差が大きくなる場合も多い。さらに、マイクロバルブ、マイクロポンプなどの可動部や、電気浸透流に代表される電氣的な力、さらにマイクロヒーターなどによる熱流動が複雑に絡み合ったものとなることから、マイクロ流動を十分に解析できる手段は開発されていない¹⁴⁾。そこで、本研究ではマイクロ流路内の流れについてCAEによる流体解析を用いた評価と、作製したマイクロ流体デバイスを用いた送液実験による実験的評価との両面から検討を行い、マイクロ流路形状の最適化を検討した。

本章では、2章で述べたレーザによるマイクロ加工技術と樹脂ラミネート法を用いて、血液検査用 μ TASの作製を目的として、血液検査用 μ TASの構成要素となる数種類のマイクロ流体デバイスを作製し、それぞれのマイクロ流体デバイスに血液と生理食塩水を流し血球の観察を行ったので報告する。具体的には、三又構造マイクロ流路や小径パイプを挿入したマイクロ流路を用いた血球整列に関する検討を行った。また、フッ素樹脂を用いた血球変形能観察用マイクロ流路における血球変形能に関する検討を行った。最後に、重力を利用した流体駆動による血球整列と血球変形能観察に関する検討を行った。

3.2 三又構造マイクロ流路を用いた血球整列

3.2.1 三又構造マイクロ流路のマイクロ流体デバイスの作製

マイクロ流体の特性を調べることを目的として、3本の支流路が1本の流路に合流する三又構造のマイクロ流路をもつマイクロ流体デバイスを作製した。流路形状は、幅約 $50\mu\text{m}$ 、深さ約 $45\mu\text{m}$ の矩形断面形状の3本の支流路が、幅約 $150\mu\text{m}$ 、深さ約 $45\mu\text{m}$ の矩形断面形状の流路に合流する三又構造とした。熱硬化性ラミネートフィルムへのレーザ加工条件を表3-1に示す。レーザ加工した三又構造の微細溝のSEM観察写真を図3-1に示す。エッジ形状もきれいであり、良好な加工形状と加工面粗さの微細溝が得られた。次に、図3-2に示すように溝に熱硬化性ラミネートフィルムを接着することによって流路を形成し、流路の流入穴にシリコンチューブとシリンジ接続用のコネクタを接着してマイクロ流体デバイスを作製した。送液実験を行う前のマイクロ流体デバイスの外観写真を図3-3に示す。ラミネート接着部やチューブとの接続部からの液漏れや樹脂フィルムの剥離などもなく、送液可能なマイクロ流体デバイスを作製することができた。

表 3-1 熱硬化性ラミネートフィルムの加工条件

| | |
|---------|--|
| 加工装置 | Exitech 社製エキシマレーザ加工機 PS2000 LAMBDA PHYSIK 社製発振機 LPX200i |
| レーザ波長 | 248 nm |
| 縮小光学系倍率 | 10 倍レンズ系 |
| 発振エネルギー | 150 mJ |
| フルエンス | 0.75 J/cm^2 |
| 発振周波数 | 100 Hz |
| ビーム形状 | $\phi 53\mu\text{m}$ |

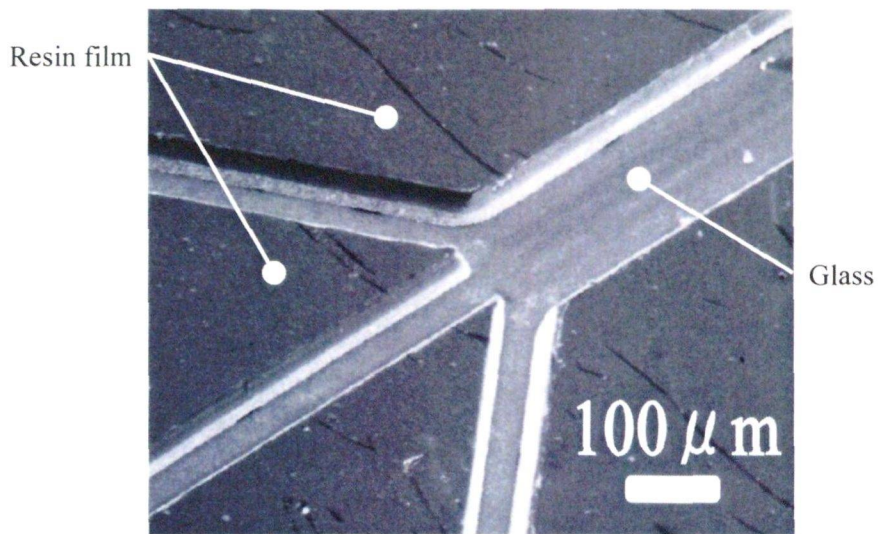


図 3-1 レーザ加工した三又構造の微細溝のSEM観察写真

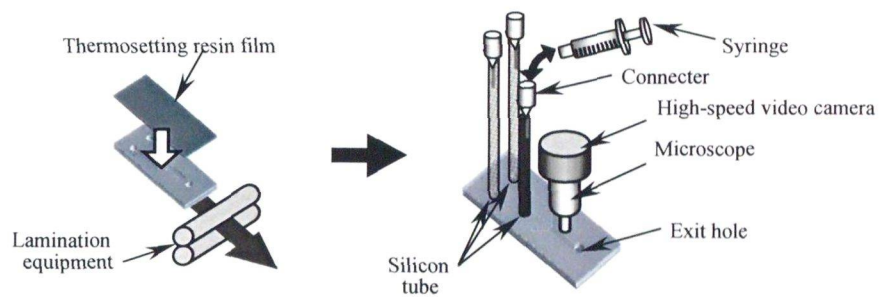


図 3-2 マイクロ流体デバイスの概念図

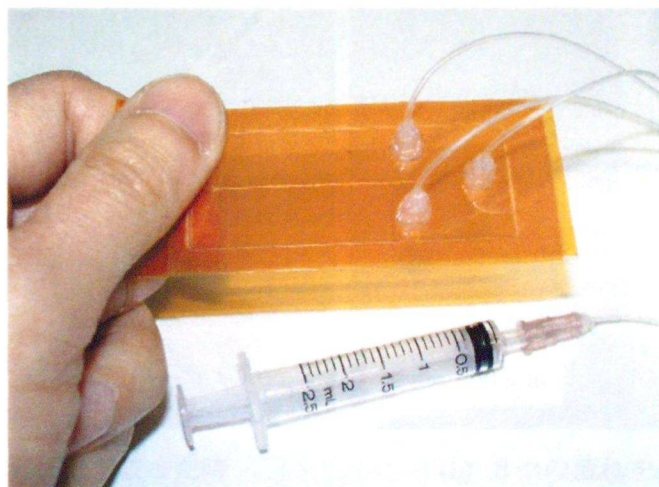


図 3-3 マイクロ流体デバイスの外観例

3.2.2 インクを用いた送液実験

はじめに、インクを用いて三又構造の流路における液体の合流状態や流れに対する圧力の影響など、マイクロ流体の基本的な特性を調べた。前節で述べたマイクロ流体デバイスに、3本のシリンジを取り付け手動やシリンジポンプによってインクをマイクロ流路に送液し、光学顕微鏡に取り付けた高速度ビデオカメラによって流路内の流れ状態を観察した。3本の支流路にそれぞれ赤、青、黄色のインクを送液した。三又構造マイクロ流路の合流位置における光学顕微鏡観察写真を図 3-4 に示す。流れが完全に層流状態となり、合流部分で混ざり合わないことがわかる。中央の青インクは数 mm 下流でも同じ幅で流れていた。

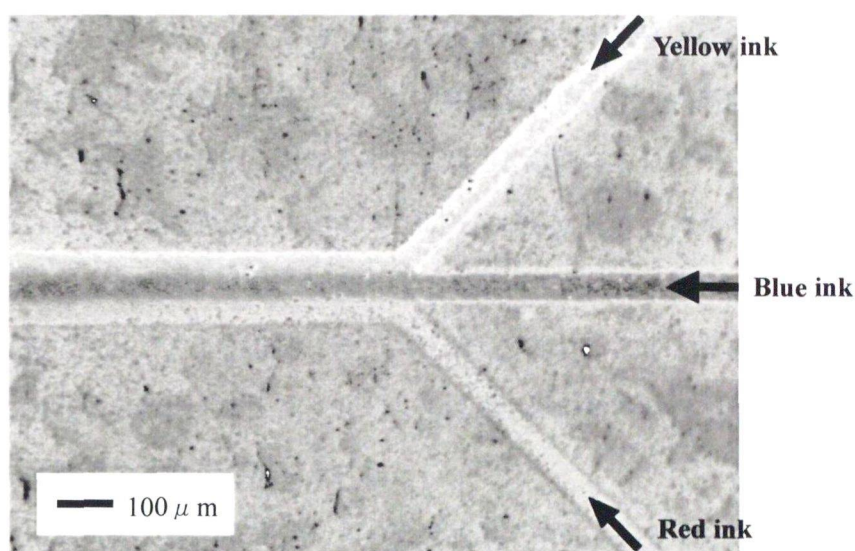
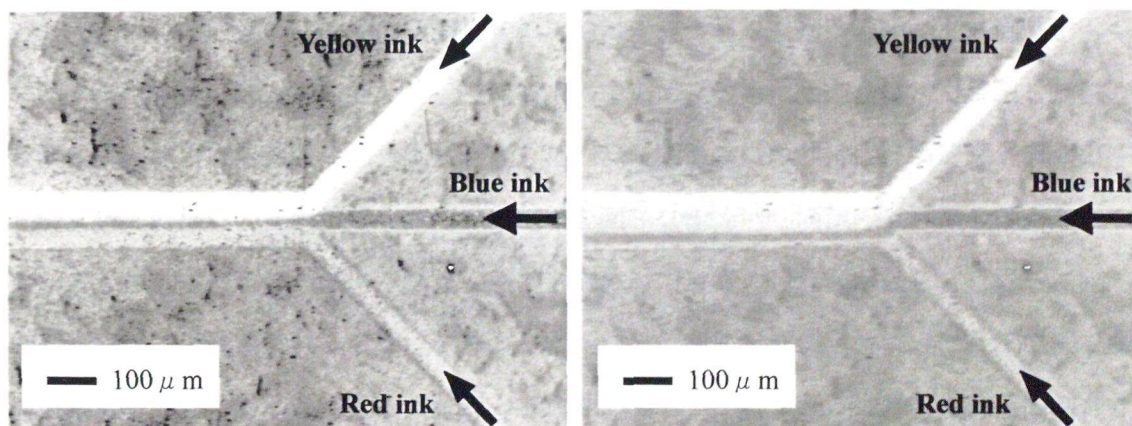


図 3-4 三又構造マイクロ流路におけるインクの流れ



(a) 中央の流れ幅を絞った時

(b) 3つの流れを偏らせた時

図 3-5 水圧を変化させた時のインクの流れ

また、3本の支流路のそれぞれの水圧(流量)を変化させることにより、三又流路におけるそれぞれの流れ幅を変化させることができた。図 3-5 (a) は中央の青色インクの流れを一定とし、両側の支流路の水圧を増加させることによって、中央の青色インクの流れ幅を絞った時の光学顕微鏡写真である。また、図 3-5 (b) は上方の支流路に送液した黄色インクの水圧を増加させることによって、中央の流れを偏らせることも容易にできた。

3.2.3 血液を用いた送液実験と血球整列

試料がシース液に包まれた状態で流れるシースフロー現象と前節で述べた三又構造マイクロ流路の圧力調節による流れ幅を制御する方法を応用して、血液の流れ幅を変化させ血球を整列させる実験を行った。三又構造の中央の支流路に生理食塩水で希釈した自己血を流し、両側の支流路に生理食塩水を流した。光学顕微鏡に取り付けた高速度ビデオカメラによって流路内の流れ状態を観察した結果を図 3-6 および図 3-7 に示す。両側の支流路の圧力を高くすることによって図 3-6 に示すように三又構造マイクロ流路の合流位置で血液の流れ幅が絞られ、合流位置から数 mm 離れた下流位置では図 3-7 に示すように赤血球が一列に並んだ状態で流れることが確認できた。ただし、図 3-8 に示す模式図のように、合流位置における血液の流れは上下方向すなわち流路深さ方向の流れ幅が $45\text{ }\mu\text{m}$ あり、流路底面を転がるように流れる血球も観察された。

次に、図 3-9 に示す模式図のように、マイクロ流路の深さ寸法を小さくすることによって、血液の上下方向の流れ幅を狭くし、流路深さ方向の血液の流れについても血球を整列させる実験を行った。幅約 $50\text{ }\mu\text{m}$ 、深さ $16\text{ }\mu\text{m}$ の矩形断面形状の3本の支流路が、幅約 $150\text{ }\mu\text{m}$ 、深さ約 $16\text{ }\mu\text{m}$ の矩形断面形状の流路に合流する三又構造のマイクロ流路をもつマイクロ流体デバイスを作製した。三又構造の中央の支流路に生理食塩水で希釈した血液を流し、両側の支流路に生理食塩水を流した。光学顕微鏡に取り付けた高速度ビデオカメラによって流路内の流れ状態を観察した結果を図 3-10 に示す。両側の支流路の圧力を高くすることによって三又構造マイクロ流路の合流位置で血液の流れ幅が絞られ、さらに流路底面を転がるように流れる血球は少なかった。しかし、図 3-10 に示すように合流位置で血球凝集塊が発生してしまった。これは、赤血球の大きさが約 $8\text{ }\mu\text{m}$ に対して流路の深さ寸法が $16\text{ }\mu\text{m}$ であるために血球が壁面に接触する確率が大きくなったことと、2つ以上の赤血球が付着した状態で流れた場合に流路内に留まる可能性が大きくなったことなどが原因であると考えられる。

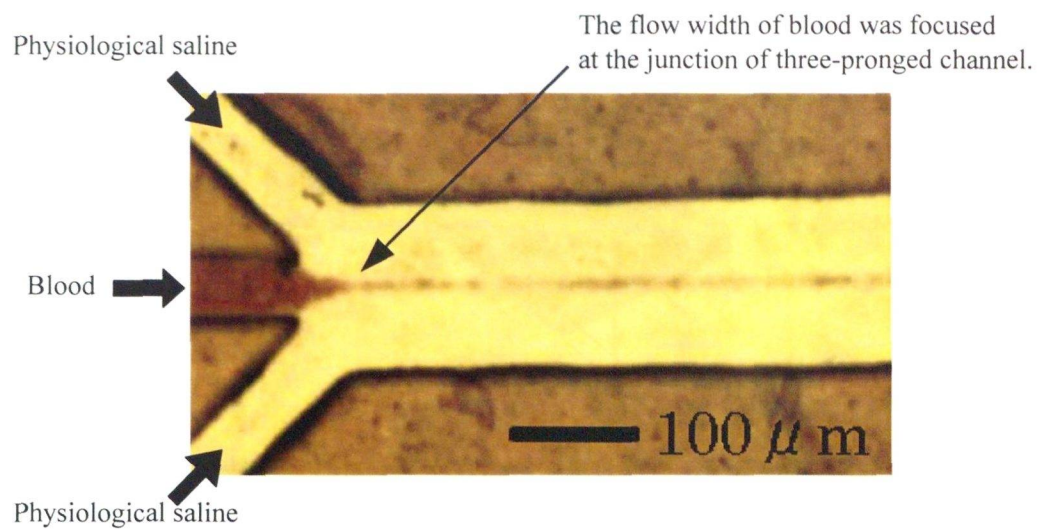


図 3-6 三又構造マイクロ流路の合流位置における血液の流れ

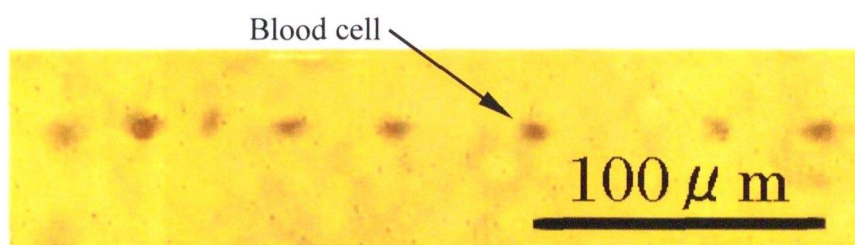


図 3-7 三又構造マイクロ流路の下流部における血球整列

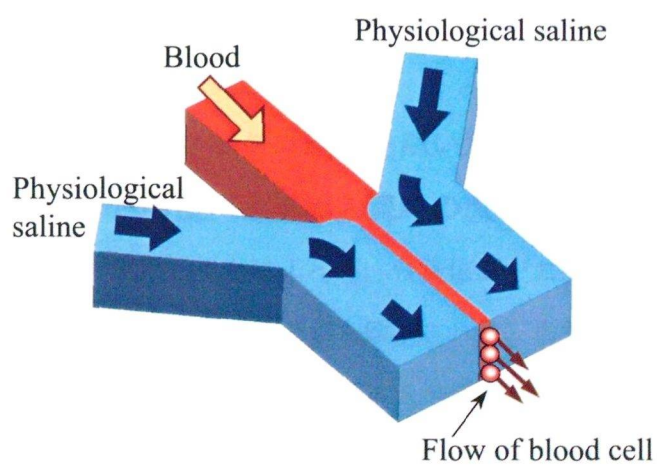


図 3-8 三又構造マイクロ流路における血液の流れの模式図

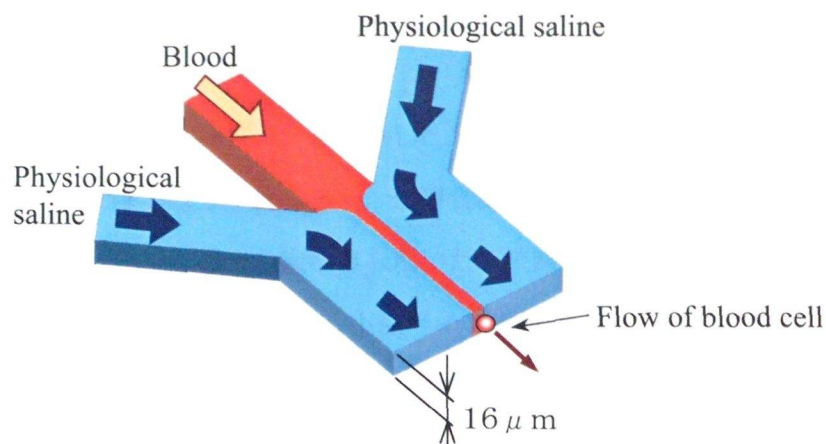


図 3-9 薄型三又構造マイクロ流路における血液の流れの模式図

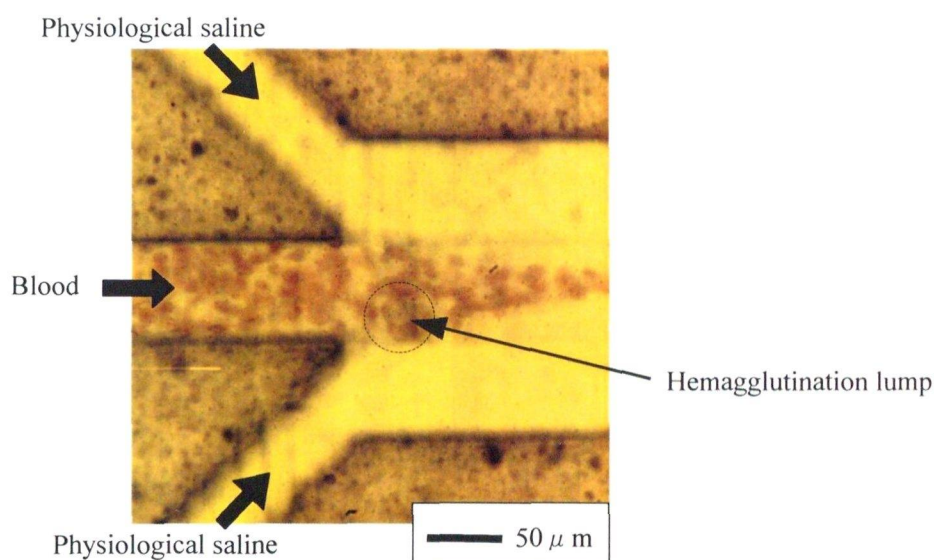


図 3-10 薄型三又構造マイクロ流路における血液の流れ

3.3 小径パイプを挿入したマイクロ流路を用いた血球整列

3.3.1 流体解析を用いた小径パイプ挿入流路の流路設計

三又構造マイクロ流路を用いることによって、合流位置で血液の流れ幅を絞ることができたが、流路底面を転がるように流れる血球も観察された。また、その対策として薄型三又構造マイクロ流路を用いた場合には、血球凝集塊が発生してしまう問題点があった。そこで、図 3-11 に示すように血液と生理食塩水の合流部において血液の流れの全周を生理食塩水のシースフローで覆うことを目的として、小径パイプを挿入した立体流路に関する検討を試みた。はじめに、CAEによる流体解析を用いて、生理食塩水の流れによって血液

の流れの全周から血液の流れ幅を絞ることが可能な立体流路の形状を設計した。

主な解析条件を表 3-2 に示す。流体解析ソフトは「ANSYS-CFX Ver10.0」を使用し、要素分割ソフトは「ICEM-CFD Ver10.0」を使用した。流体の物性値は血液の密度や粘性係数の値を用いた。本解析は 1 成分解析であり、生理食塩水は血液の物性値に近いため、生理食塩水の流体部分についても同一の物性値を用いた。流路構成、流路寸法を変更して流路設計を行った。樹脂フィルム積層による小径パイプを挿入した立体流路を設計した概略図を図 3-12 に示す。主流路の寸法を $200\text{ }\mu\text{m}\times 180\text{ }\mu\text{m}$ とし、小径パイプが取り付けられる支流路の寸法を $100\text{ }\mu\text{m}\times 100\text{ }\mu\text{m}$ とし、生理食塩水用の支流路の寸法を $100\text{ }\mu\text{m}\times 90\text{ }\mu\text{m}$ とした。また、小径パイプの寸法は外径 $100\text{ }\mu\text{m}$ 、内径 $30\text{ }\mu\text{m}$ 、長さ 5mm とした。図 3-13 に流体解析を行った流路のモデル図と境界条件を示す。

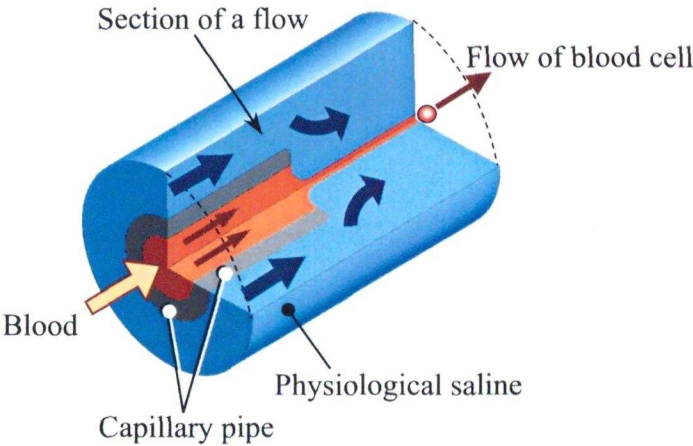


図 3-11 小径パイプ流路(同軸流れの流路)における血液の流れの模式図

表 3-2 小径パイプ挿入流路の流体解析の条件

| | |
|---------|---|
| 流体解析ソフト | ANSYS-CFX Ver10.0 |
| 要素分割ソフト | ICEM-CFD Ver10.0 |
| 流体物性値 | 密度： $1.06\times 10^3\text{ kg/m}^3$ |
| | 粘性係数： $4.71\times 10^{-3}\text{ Pa}\cdot\text{s}$ |
| 要素分割サイズ | $10\text{ }\mu\text{m}$ |
| 要素の種類 | 4 面体要素 |
| | 壁面近傍：プリズム要素（3 層） |

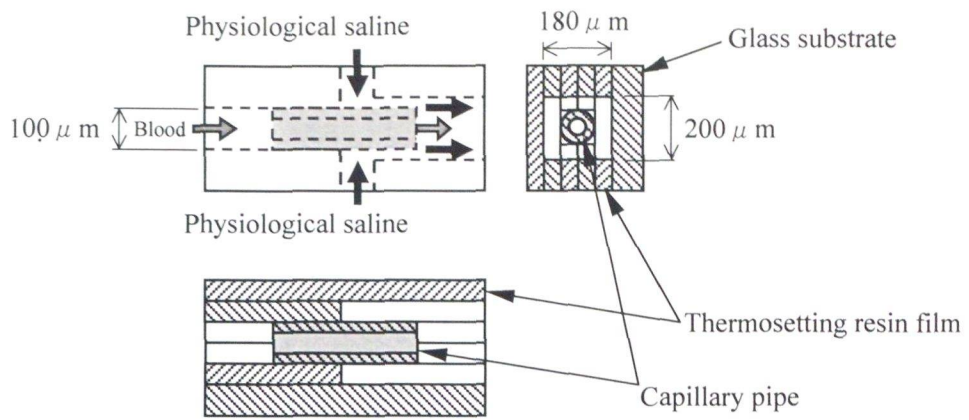


図 3-12 小径パイプを挿入したマイクロ流路の概略図

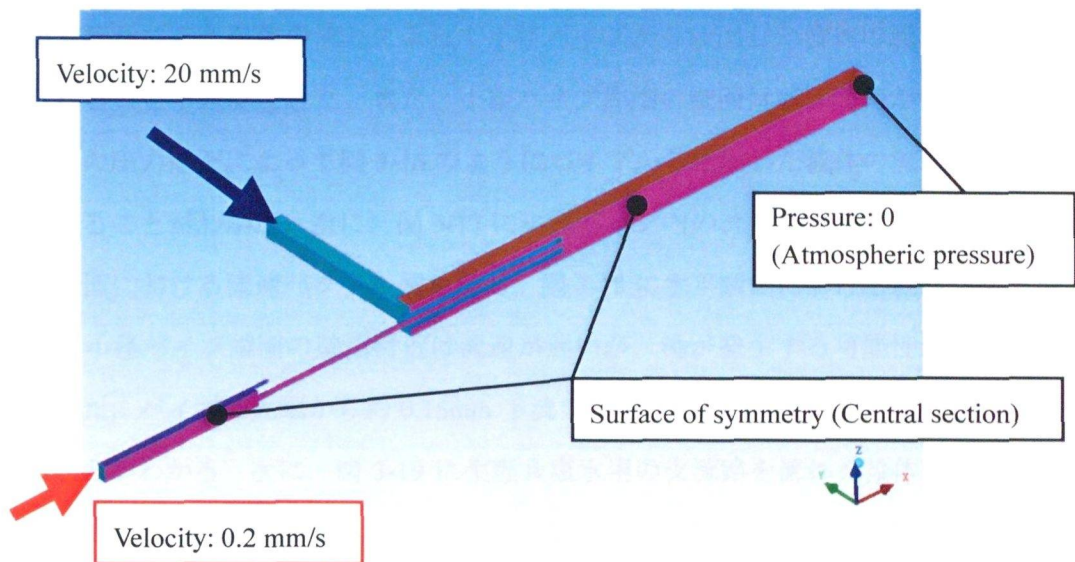


図 3-13 流体解析に用いた小径パイプ挿入流路のモデル図 (1 / 2 対称モデル)

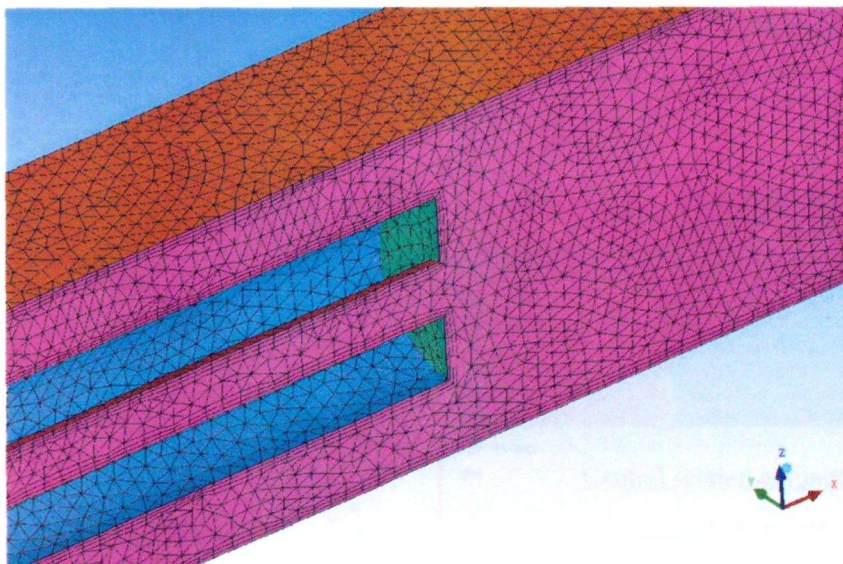


図 3-14 流体解析における要素分割図の合流部周辺の断面拡大図

流路および流れが対称形状であるため、3次元モデルは1/2対称モデルを使用し、断面に相当するサーフェスに対称境界条件を設定した。流れに関する境界条件では、血液用支流路の入口面に流速 0.2mm/s を与え、生理食塩水用支流路の入口面に流速 20mm/s を与え、出口面に圧力がゼロすなわち大気開放の境界条件を設定した。要素分割では、要素寸法を $10\mu\text{m}$ とし、壁面近傍では流速変化に対応できるようにプリズム要素を使用してさらに3層分割を行った。図 3-14 に小径パイプ内の流れが主流路に合流する周辺における要素分割図を示す。

流体解析を行った解析結果について、図 3-15 に圧力分布のコンター図を示し、図 3-16 に小径パイプ内の流れが主流路に合流する位置における流線とその流速を示す。小径パイプ外周を流れてきた流体の流れによって小径パイプから吐出した流体の流れ幅が全周から絞られることが確認できた。また、小径パイプ先端の壁面付近は圧力が低いことがわかり、この圧力低下によって図 3-16 のようにパイプから吐出した流体の流れ幅が一度数 μm 広がることがわかる。次に、図 3-17 に小径パイプ内の流れが主流路に合流する位置の垂直断面における流速ベクトル図を示し、図 3-18 に水平断面における流速ベクトル図を示す。小径パイプ端面の壁面付近は流速が遅いが、渦が発生する可能性が少ないといえる。また、パイプの先端から約 0.15mm 下流で中心の流速が早くなり一定な流れになっていることがわかる。次に、図 3-19 に生理食塩水用の支流路を流れる流体の流線とその流速を示し、図 3-20 に小径パイプ外周部を流れる流体の流線とその流速分布を示す。矩形断面の流路であるため、パイプ外周部の流速が少し不均一なことがわかる。ただし、パイプが円筒形状であるため、合流する流れに大きな影響はないと考えられる。

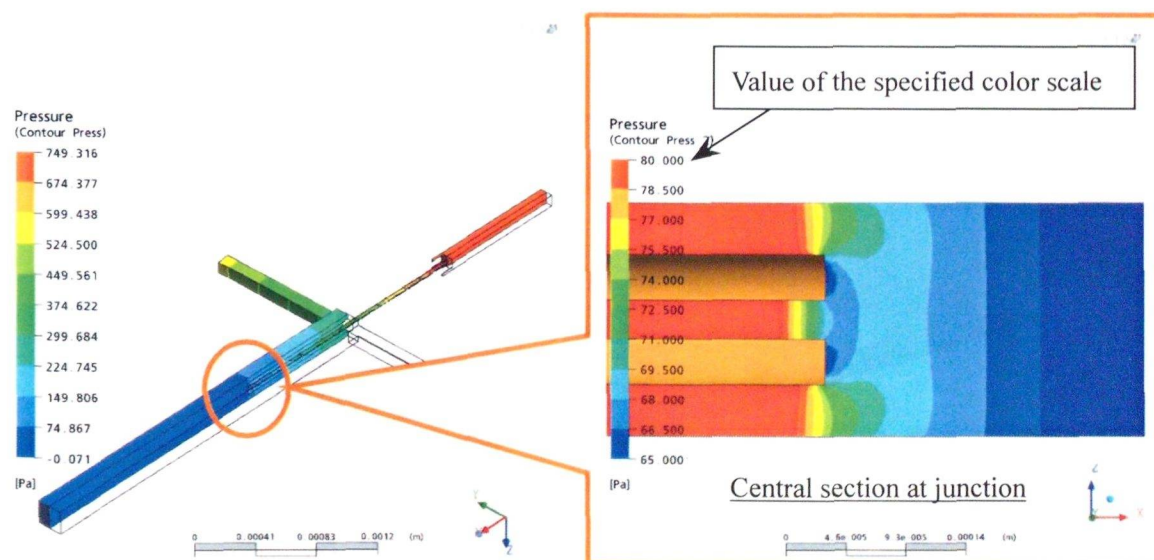


図 3-15 圧力分布を表示した流体解析結果

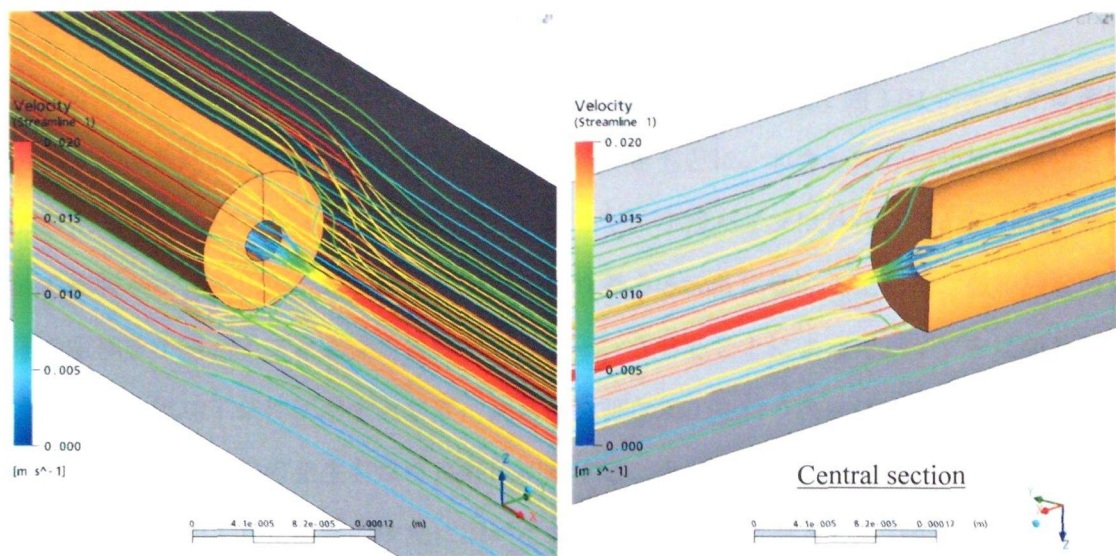


図 3-16 合流部分における流線と流速を表示した流体解析結果

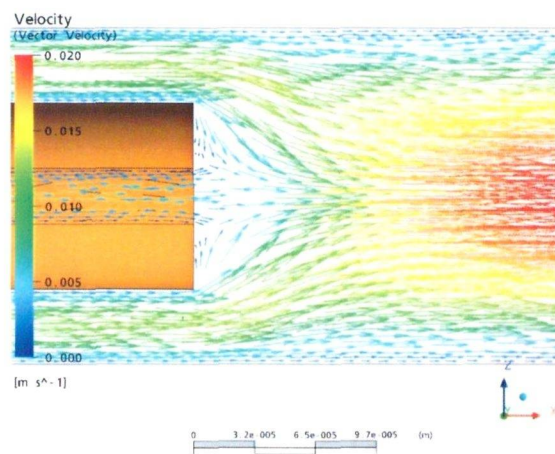


図 3-17 流速ベクトル図（垂直断面）

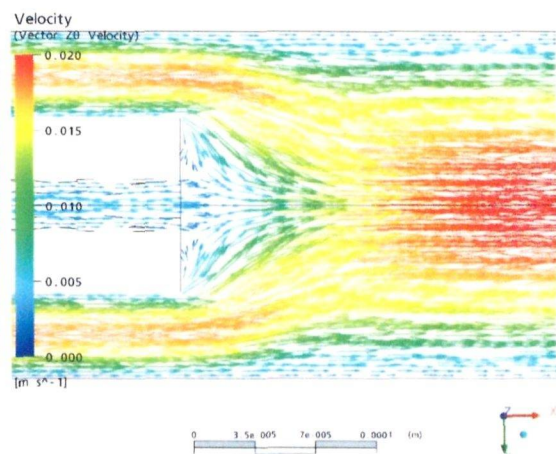


図 3-18 流速ベクトル図（水平断面）

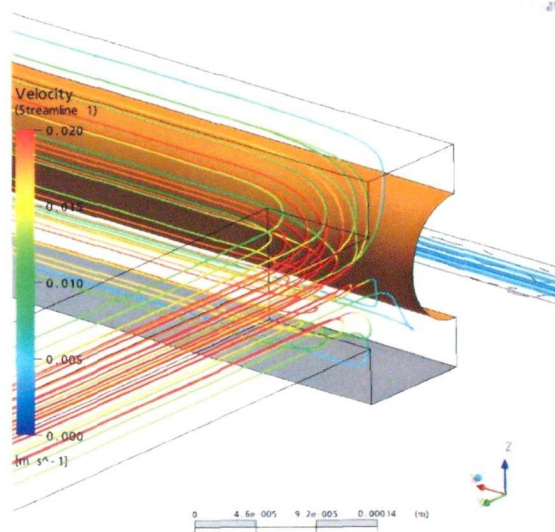


図 3-19 生理食塩水の流線と流速（支流路）

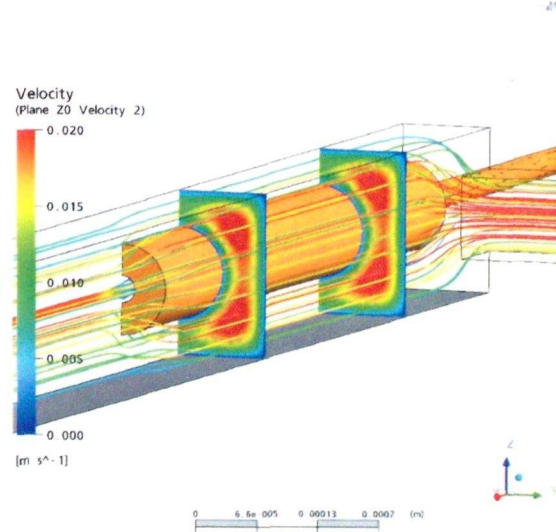


図 3-20 生理食塩水の流線と流速分布断面図

3.3.2 小径パイプを挿入したマイクロ流体デバイスの作製

流体解析を用いて設計を行った小径パイプ挿入流路を作製する．図 3-21 にマイクロ流体デバイスの概略図を示す．表 3-3 に示す加工条件をもとに，エキシマレーザ加工機により熱硬化性ラミネートフィルムに微細溝を加工した．小径パイプは外径 $100\text{ }\mu\text{m}$ ，内径 $30\text{ }\mu\text{m}$ の銅製パイプを用い，微細放電加工機により長さ 5 mm に切断加工した．微細放電加工用の電極を小径パイプと直交する方向にスキャンさせることによってパイプを切断した．表 3-4 の放電加工条件に示すとおり，非常に微細な加工を行う条件にすることによって，内径の潰れやバリ等の発生もなく良好に切断することができた．ラミネートフィルムを積層してレーザ加工した流路の中央に銅パイプを取り付けた構造とした．図 3-22 は 4 層と 5 層のラミネートを行う前の 3 層目までの構造の SEM 観察写真であり，図 3-23 は小径パイプの先端部分すなわち流路の合流位置を拡大した SEM 観察写真である．比較的良好な加工形状と加工面粗さが得られた．次に，4 層目および 5 層目についてもラミネート接着およびレーザ加工を行い，小径パイプ流路を持つマイクロ流体デバイスを作製した．

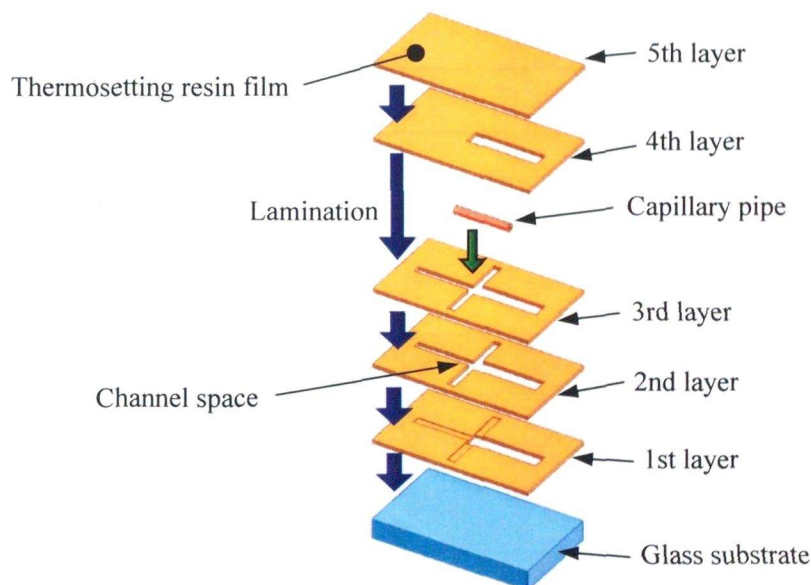


図 3-21 小径パイプを挿入したマイクロ流体デバイスの概略図（展開図）

表 3-3 熱硬化性ラミネートフィルムの加工条件

| | |
|---------|---|
| 加工装置 | Exitech 社製エキシマレーザー加工機 PS2000 LAMBDA PHYSIK 社製発振機 LPX200i |
| レーザ波長 | 248 nm |
| 縮小光学系倍率 | 10 倍レンズ系 |
| 発振エネルギー | 150 mJ |
| フルエンス | 0.75 J/cm ² |
| 発振周波数 | 100 Hz |
| ビーム形状 | 108 μ m \times 108 μ m |

表 3-4 小径パイプの切断加工条件

| | |
|--------|---------------------------|
| 加工装置 | 三菱電機(株)製 微細放電加工機 EDSCAN8E |
| 電極 | ϕ 0.5mm タングステン電極 |
| 電気条件 | E855 (微細加工用条件) |
| 加工モード | FAP, サーボ 30 |
| スキャン回数 | 1 パスによる切断 |
| 電極回転 | 固定 |

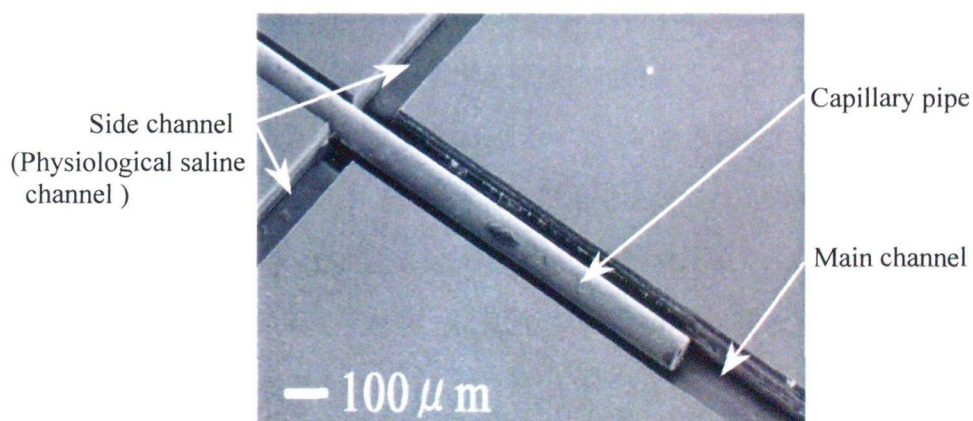


図 3-22 3 層目までの小径パイプを挿入した微細溝の SEM 観察写真

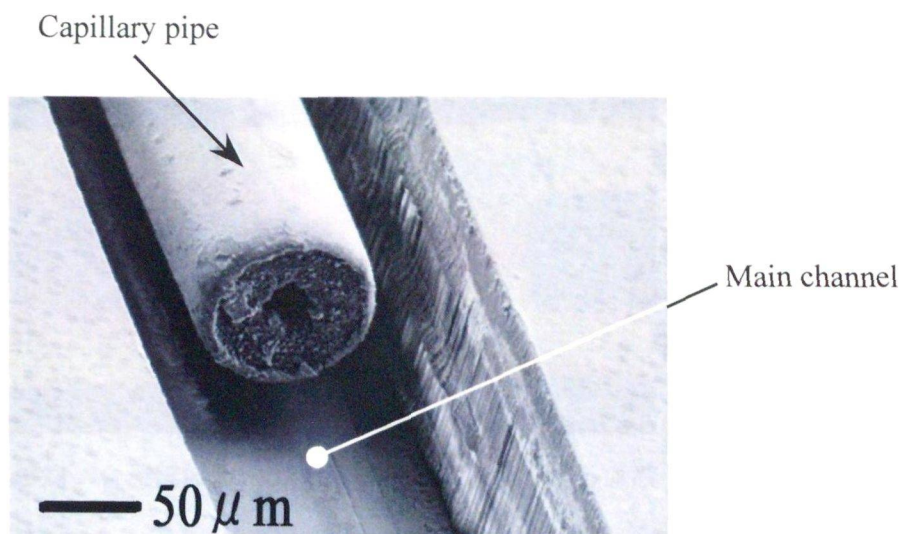


図 3-23 小径パイプ先端部分とパイプを挿入した微細溝の S E M 観察写真

3.3.3 血液を用いた送液実験と血球整列

前節で述べたマイクロ流体デバイスに、2本のシリンジを取り付けシリンジポンプによって液体をマイクロ流路に送液し、光学顕微鏡に取り付けた高速度ビデオカメラによって流路内の流れの状態を観察した。小径パイプにつながる支流路に生理食塩水で希釈した自己血を送液し、もう1つの支流路に生理食塩水を送液して支流路の両側から主流路に生理食塩水を流した。小径パイプ内の流れが主流路へ合流する位置における光学顕微鏡観察写真を図 3-24 および図 3-25 に示す。図 3-24 のように内径 $30\mu\text{m}$ の小径パイプの中に血液を流すことができ、生理食塩水と合流する流路に吐出することができた。さらに、生理食塩水の圧力を高くすることにより図 3-25 に示すように血液の流れ幅が絞られ、赤血球が一行に並んだ状態で流れることが確認できた。下流では全ての血球が同一速度で流れており、血液の上下の流れ幅や流路底面を転がるように流れる血球もないことが確認でき、このことから血球が流路に対して一直線上に流れていると考えられる。また、図 3-26 に合流部分の拡大図を示す。血液と生理食塩水の合流部分において、血球の流れが生理食塩水によって全周から絞られ、血球が一行に並んでいく状態が確認できた。

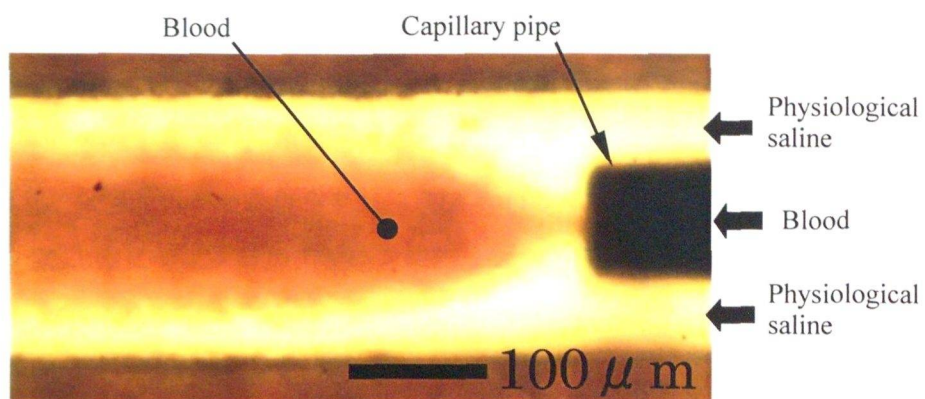


図 3-24 合流部において小径パイプから吐出する血液

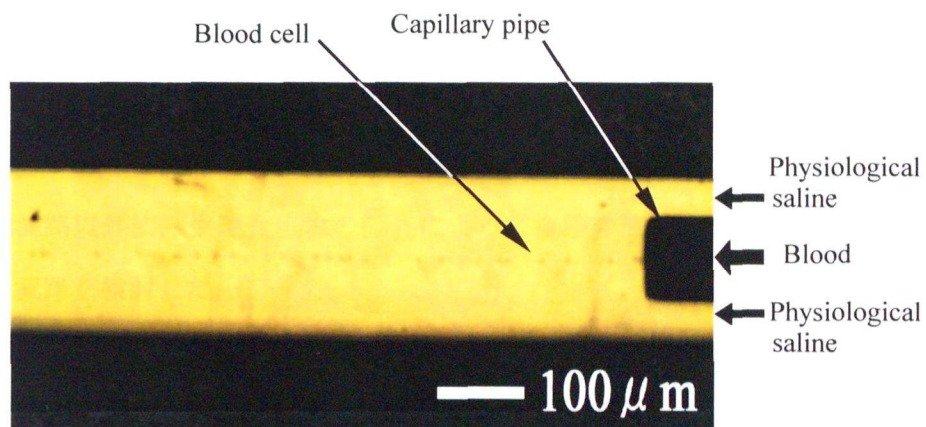


図 3-25 小径パイプ挿入流路の合流位置における血液の流れ

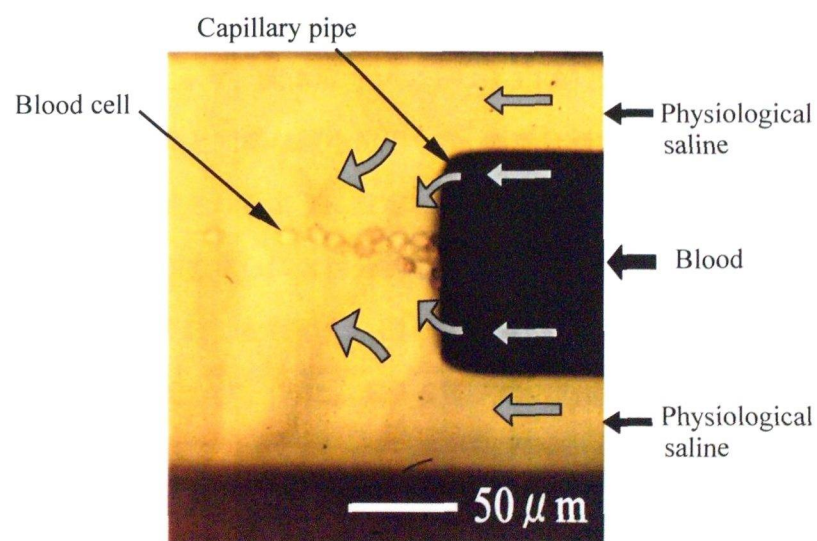


図 3-26 小径パイプ挿入流路の合流位置における血球整列 (図 3-25 の合流部の拡大図)

3.4 2段階合流流路を用いた血球整列

3.4.1 流体解析を用いた流路設計

血液は粘性の高いコロイド状の流体でタンパク質などを含むため、流路幅が数 μm の微細流路に血液を流すと直ちに閉塞する可能性が考えられる。しかも、数 μm の微細流路を精度良く、かつ面粗さも良好な状態で加工を行うことは容易ではない。そこで、前節までに述べたようにマイクロ加工技術と樹脂ラミネート法を用いて、三又構造の微細流路をもつマイクロ流体デバイスや、小径パイプを挿入した立体流路をもつマイクロ流体デバイスを作製した。さらに、これらのマイクロ流体デバイスを用いて、試料がシース液に包まれた状態で流れるシースフロー現象と圧力調節による流れ幅を制御する方法を応用することによって、合流位置で生理食塩水の流れによって血液の流れ幅が数 μm に絞られた状態で流れることが確認できた。ただし、小径パイプの内径は $30\mu\text{m}$ であり、血液が閉塞する可能性も残されている。しかし、流れが層流から乱流に移行する臨界レイノルズ数を考慮すると、流路幅寸法を大きくすることは難しい。そこで、小径パイプを挿入した微細流路以外に、生理食塩水の流れによって血液の流れ幅を絞ることを目的としたマイクロ流路を検討した。

はじめに、生理食塩水の流れによって血液の流れの左右方向と上下方向から血液の流れ幅を絞る立体流路すなわち2段階で合流する流路を提案し、CAEによる流体解析を用いて流路形状と送液条件を設計した。さらに、流路内を観察する時の光透過性を考慮して積層数を減らすことや、マイクロ流体デバイスの作製をより容易にするためにできる限り単純化した流路を設計する必要がある。

主な解析条件を表3-5に示す。流体解析ソフトは3.3.1節と同様なソフトを使用した。また、流体の物性値も3.3.1節と同様な値を使用した。要素分割では、要素寸法を $8\mu\text{m}$ とし、一番細い流路幅でも6分割されるように設定した。壁面近傍では流速変化に対応できるようにプリズム要素を使用してさらに3層分割を行った。流路構成、流路寸法、および流入部分の流速を変更して流路設計を行った。図3-27に設計した立体流路の要素分割図と流体解析を行った境界条件を示す。また、表3-6に流路の断面寸法と境界条件を示す。

表 3-5 2段階合流流路における流体解析の条件

| | |
|---------|---|
| 流体解析ソフト | ANSYS-CFX Ver10.0 |
| 要素分割ソフト | ICEM-CFD Ver10.0 |
| 流体物性値 | 密度： $1.06 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ |
| | 粘性係数： $4.71 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ |
| 要素分割サイズ | $8 \text{ } \mu\text{m}$ |
| 要素の種類 | 4面体要素 |
| | 壁面近傍：プリズム要素（3層） |

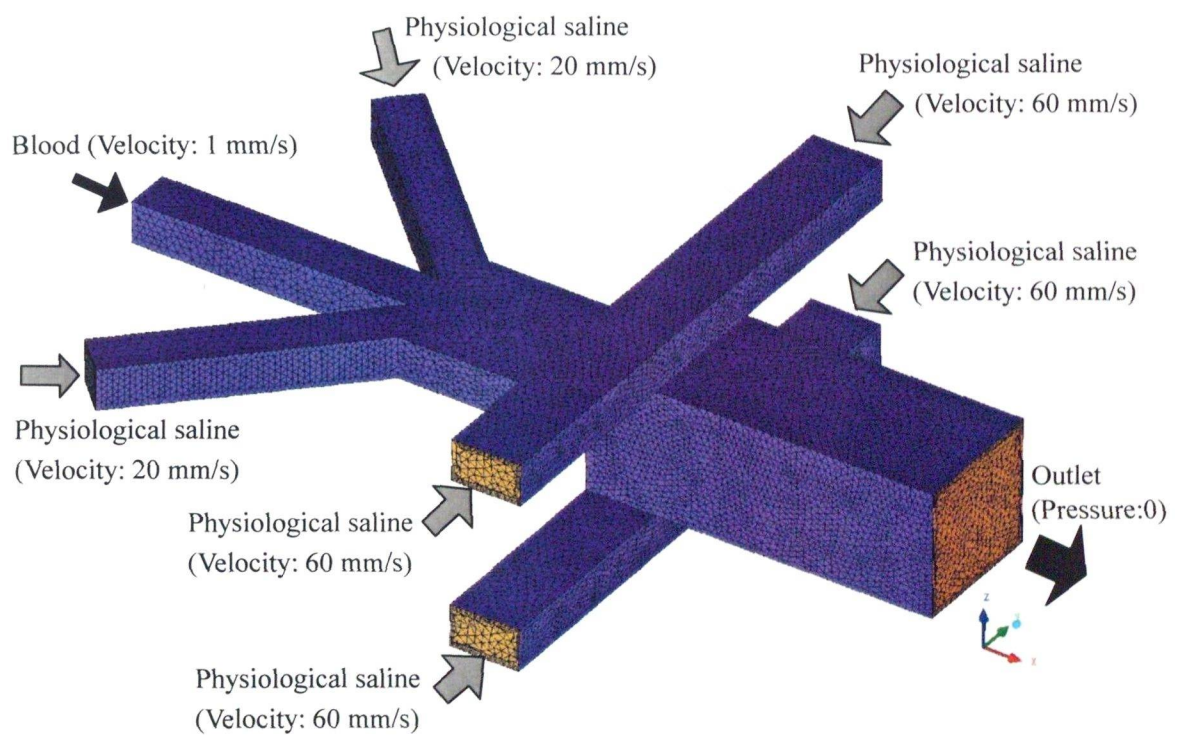


図 3-27 要素分割図と境界条件

表 3-6 2 段階合流流路における流路断面形状と境界条件

| | |
|----------|----------------------------------|
| 血液流入部 | 断面形状：0.05×0.045 mm ² |
| | 流速：1 mm/s |
| 左右流路の流入部 | 断面形状：0.05×0.045 mm ² |
| | 流速：20 mm/s |
| 上下流路の流入部 | 断面形状：0.075×0.045 mm ² |
| | 流速：60 mm/s |
| 出口部 | 断面形状：0.15×0.135 mm ² |
| | 平均圧力：0（大気解放） |

図 3-28 から図 3-32 に流体解析を行った解析結果を示す。図 3-28 に血液の流線とその流速のみを表示した鳥瞰図，上面図，側面図を示す。図 3-29 に左右方向の支流路から血液に合流する生理食塩水の流線とその流速のみを表示した鳥瞰図，上面図，側面図を示す。図 3-30 に上下方向の支流路から主流路に合流する生理食塩水の流線とその流速のみを表示した鳥瞰図，上面図，側面図を示す。血液の支流路に左右の支流路が合流する第 1 段階合流位置において血液の左右方向の流れ幅が絞られ，次に上下の支流路が合流する第 2 段階合流位置においてさらに血液の上下方向の流れ幅が絞られる解析結果が得られた。送液条件を検討することによって，上下の支流路が合流する第 2 段階合流位置において，上下方向の合流によって血液の左右方向の流れ幅が広がってしまうことを 13% 以下に低減できた。図 3-31 に水平方向の中央断面と垂直方向の中央断面における流速ベクトル図を示す。主流路の端面における速度勾配から層流状態で流れることが予測される。図 3-32 に水平方向と垂直方向の中央断面における圧力分布図を示す。合流による大きな圧力変動や加圧部分はなく，全て出口に向かって減圧していることがわかった。流体解析を用いて検討した結果，送液の条件としては，（血液流路の流速）：（左右流路の流速）：（上下流路の流速）=1：20：60 の比で流速を与えることによって血液の流れ幅が絞られる解析結果が得られた。

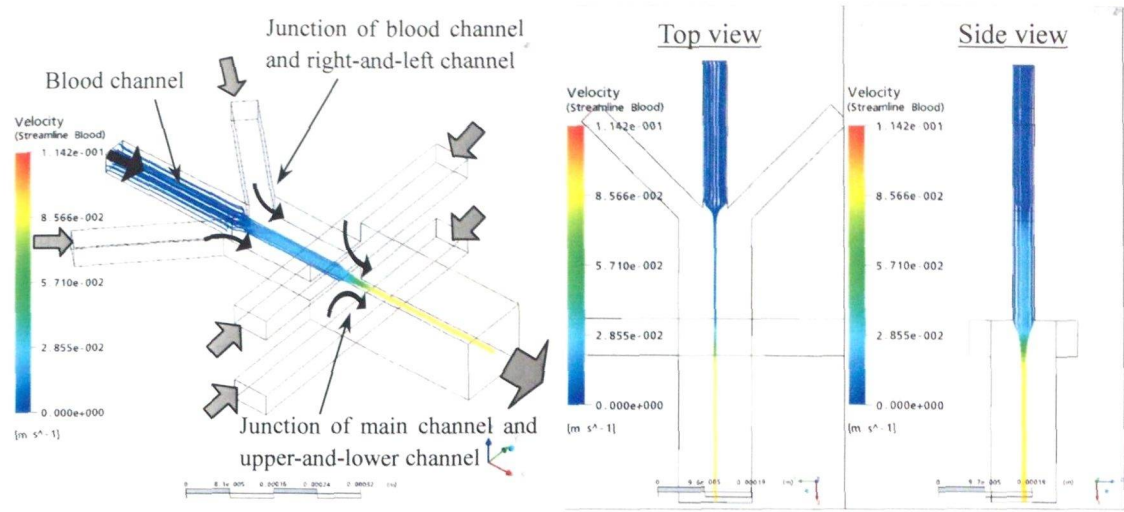


図 3-28 血液の流線のみを表示した流体解析結果

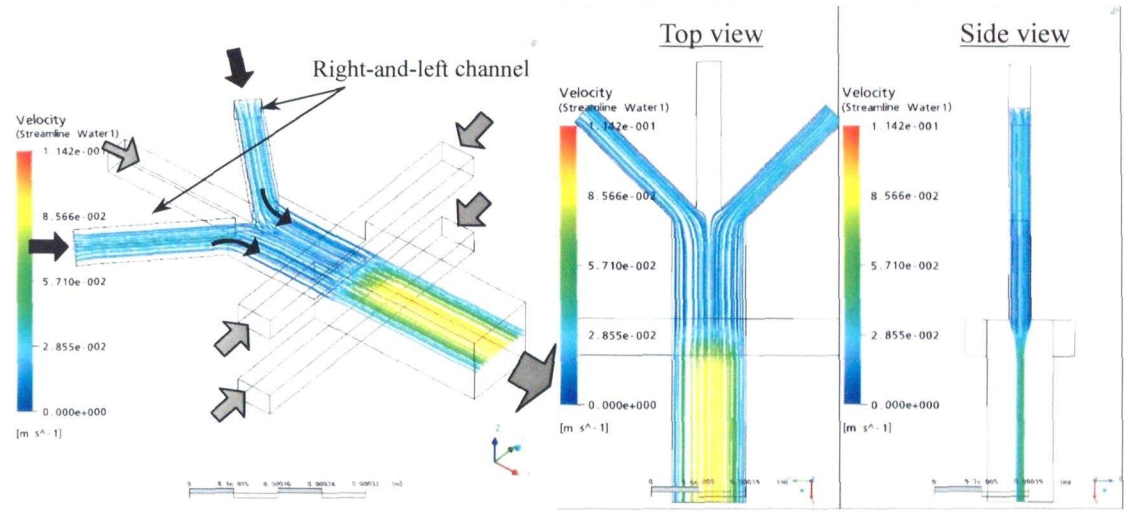


図 3-29 左右流路からの流線のみを表示した流体解析結果

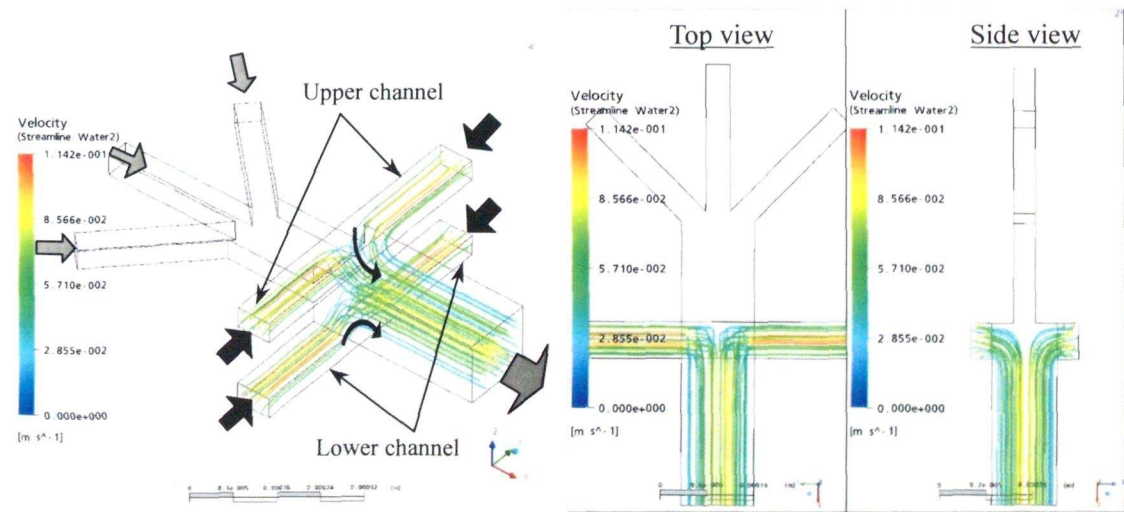
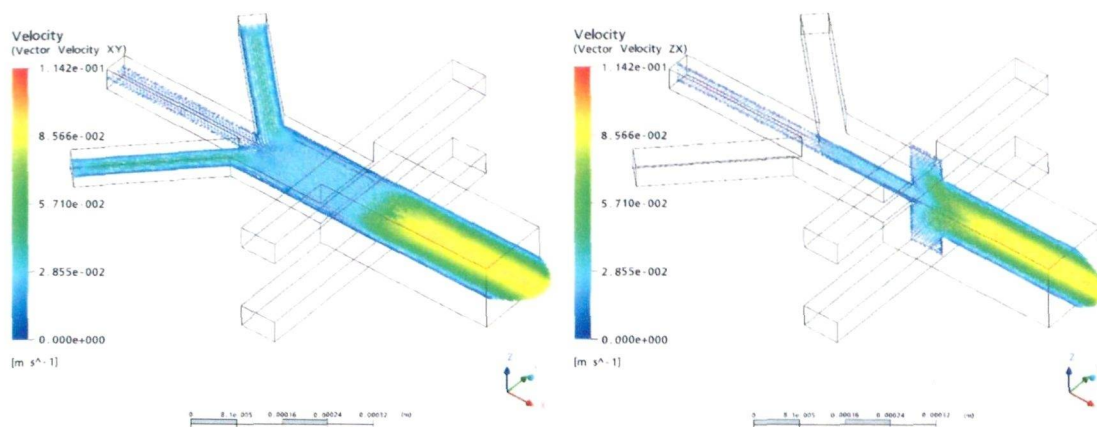


図 3-30 上下流路からの流線のみを表示した流体解析結果



(a) 水平断面における流速ベクトル

(b) 垂直断面における流速ベクトル

図 3-31 中央断面におけ流速ベクトル図

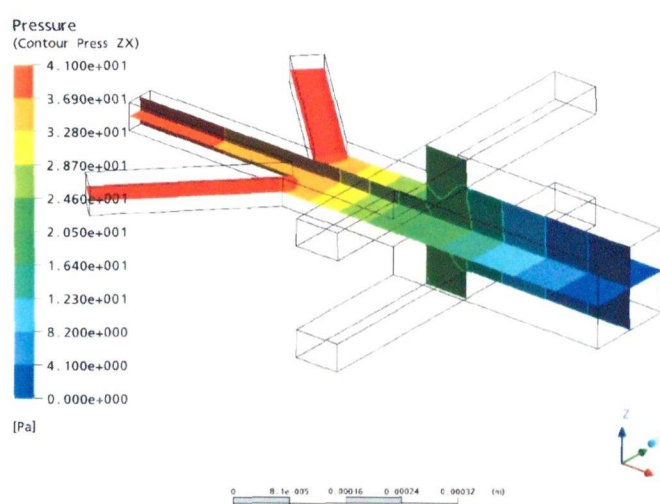


図 3-32 中央断面におけ圧力分布図

3.4.2 2段階合流の3次元立体流路の作製

流体解析を用いて設計を行った2段階合流流路を作製する．図 3-33 にマイクロ流体デバイスの概略図を示す．立体流路はガラス基板上に6層の熱硬化性ラミネートフィルムを積層させる構成である．表 3-7 に示す加工条件をもとに，エキシマレーザ加工と樹脂ラミネート法を用いて，立体流路の加工を行った．図 3-34 は2層目までの構造を作製した流路の光学顕微鏡観察写真である．フィルムが透過するため1層目で形成されている幅 $75\mu\text{m}$ ，深さ $45\mu\text{m}$ の下方流路が観察できる．この1層目の下方流路から合流する主流路の一部と

なる幅 $150\mu\text{m}$ の微細溝を加工した．図 3-35 は 3 層目までの構造を作製した流路の光学顕微鏡観察写真である．幅 $50\mu\text{m}$ ，深さ $45\mu\text{m}$ の 3 本の支流路が，幅 $150\mu\text{m}$ ，深さ $45\mu\text{m}$ の主流路へ合流する三又構造の微細溝を加工し，下流部では下方流路から合流する構造である．図 3-36 は 4 層目までの構造を作製した流路の光学顕微鏡観察写真である．3 層目で形成されている三又構造流路の主流路がフィルムを透過して観察でき，その下流部に位置する下方流路から合流する主流路を加工した．この流路は 2～4 層目で形成されているので，幅 $150\mu\text{m}$ ，深さ $135\mu\text{m}$ の流路となる．図 3-37 は 5 層目までの構造を作製した流路の光学顕微鏡観察写真である．上方流路となる幅 $75\mu\text{m}$ ，深さ $45\mu\text{m}$ の微細溝を加工した．図 3-38 は 4 層目と 5 層目を作製する前の 3 層目までの構造を SEM で斜めから観察した写真である．1 層目の下方流路から主流路へ合流する流出口が観察でき，フィルムの変形などによる流路断面形状の潰れなどもなく流出口が形成できていることがわかる．また，目標を満足する良好な加工形状と加工面粗さが得られた．

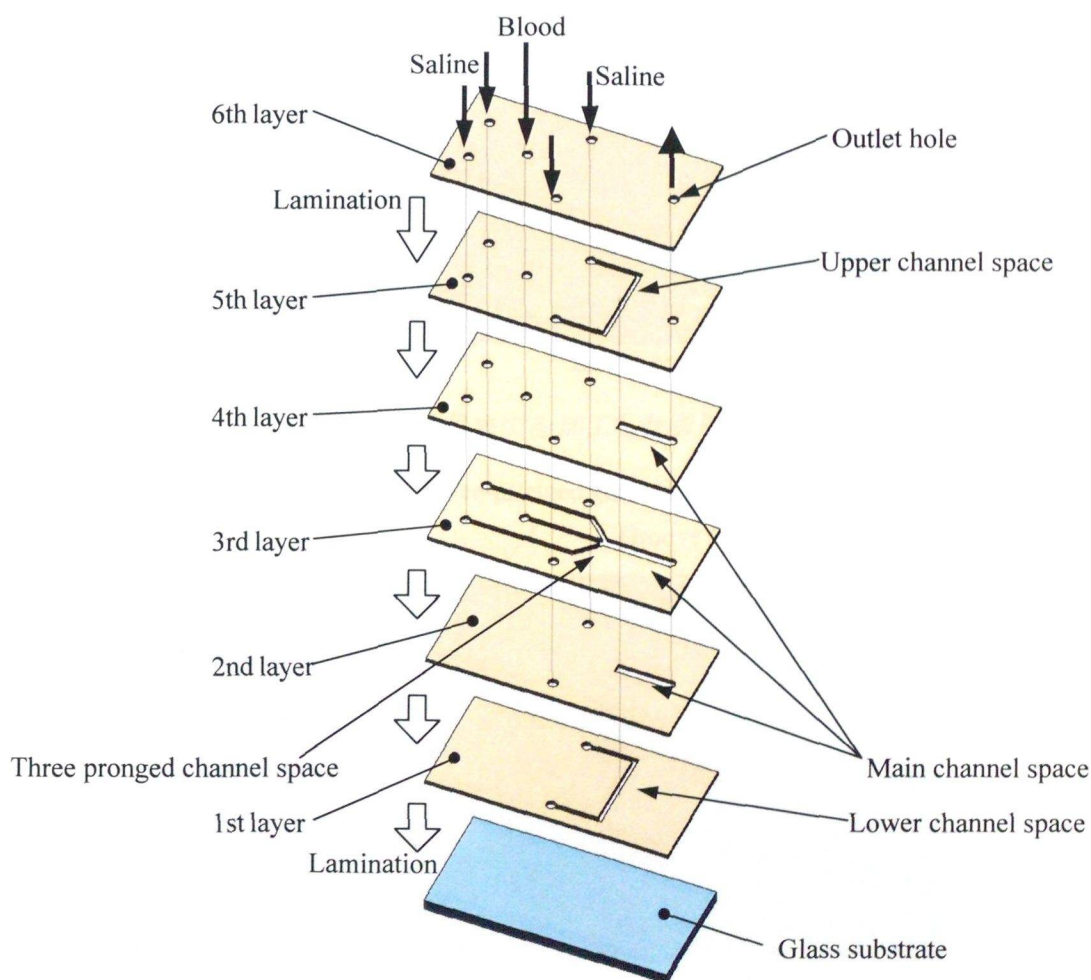


図 3-33 2 段階合流流路をもつマイクロ流体デバイスの概略図

表 3-7 熱硬化性ラミネートフィルムの加工条件

| | |
|----------|--|
| 加工装置 | Exitech 社製エキシマレーザ加工機 PS2000 LAMBDA PHYSIK 社製発振機 LPX200i |
| レーザ波長 | 248 nm |
| 縮小光学系倍率 | 10 倍レンズ系 |
| 発振エネルギー | 150 mJ |
| フルエンス | 0.75 J/cm ² |
| 発振周波数 | 100 Hz |
| ステージ移動速度 | 1.18 mm/min |
| ビーム形状 | φ 22 μ m |

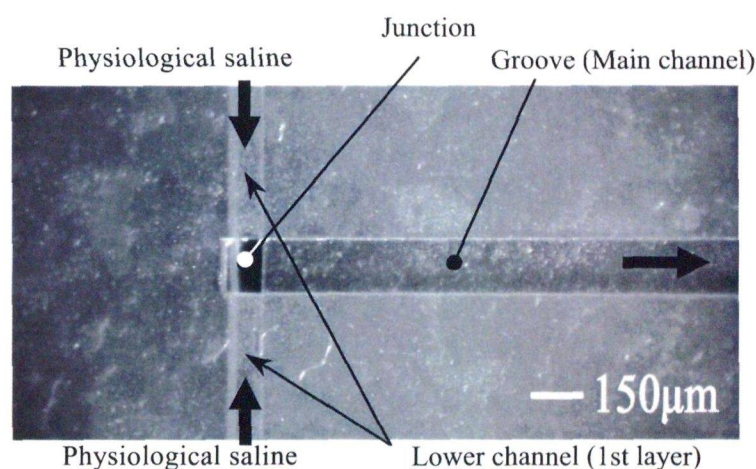


図 3-34 2段階合流流路の2層目までを加工した微細溝の光学顕微鏡観察写真

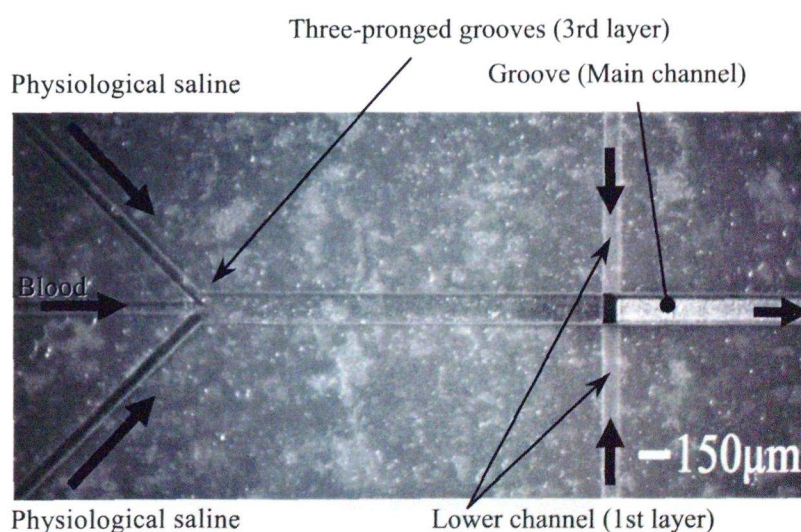


図 3-35 2段階合流流路の3層目までを加工した微細溝の光学顕微鏡観察写真

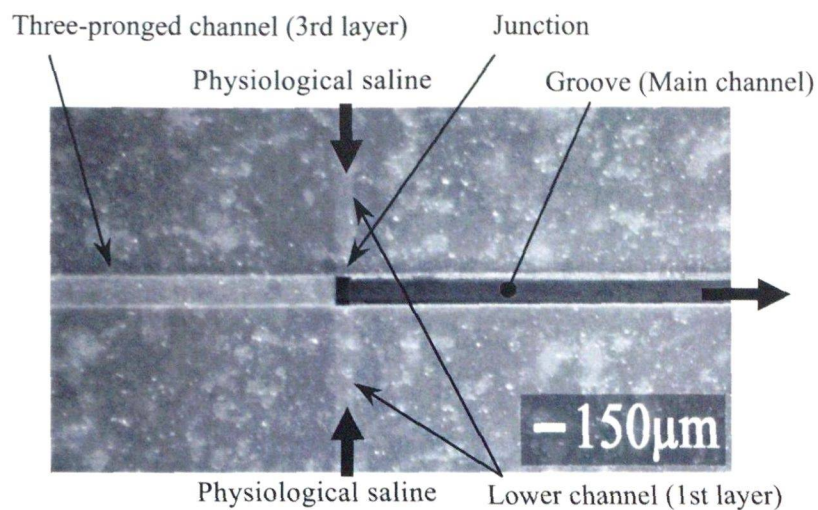


図 3-36 2段階合流流路の4層目までを加工した微細溝の光学顕微鏡観察写真

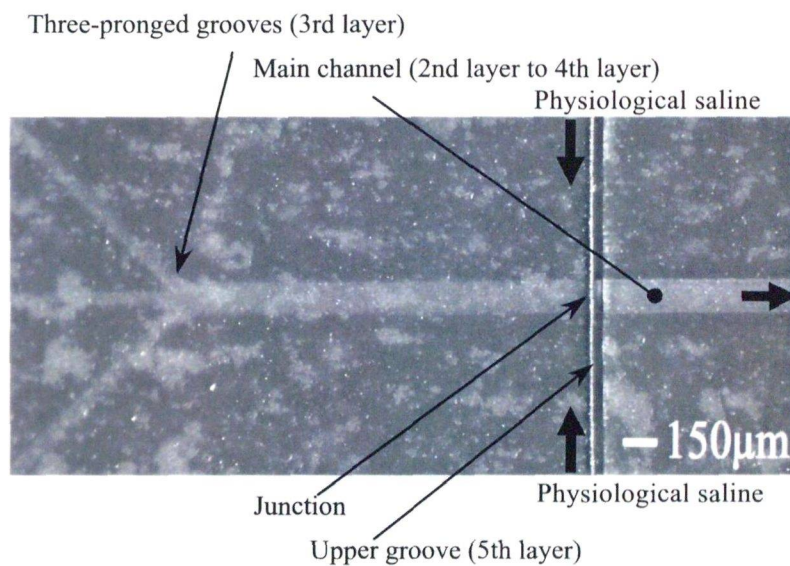


図 3-37 2段階合流流路の5層目までを加工した微細溝の光学顕微鏡観察写真

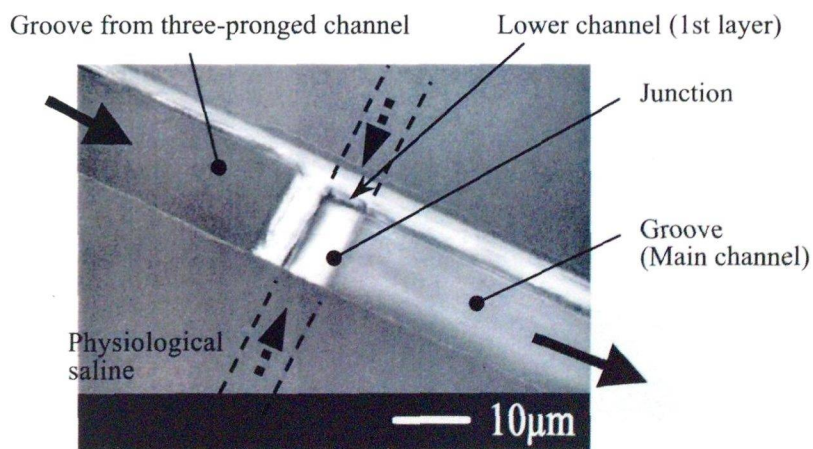


図 3-38 2段階合流流路の3層目までを加工した微細溝のSEM観察写真

3.4.3 血液を用いた送液実験と血球整列

前節で述べたマイクロ流体デバイスに、シリンジポンプによって液体をマイクロ流路に送液し、光学顕微鏡に取り付けた高速度ビデオカメラによって流路内の流れの状態を観察した。三又構造マイクロ流路の中央の支流路に生理食塩水で希釈した自己血を流し、両側の支流路に生理食塩水を流した。さらに、1層目の下方流路と5層目の上方流路に生理食塩水を流し、主流路に合流させた。三又構造マイクロ流路における血液の支流路に左右の支流路が合流する第1段階合流位置を観察した写真を図 3-39 に示す。生理食塩水の流れによって血液の左右方向の流れ幅が数 μm に絞られた状態で流れることが確認できた。第1段階合流位置の下流部に設けた下方流路と上方流路が合流する部分を観察した写真を図 3-40 に示す。血液の上下方向の流れ幅が絞られ、赤血球が整列した状態で流れることが確認できた。さらに下流部を観察した写真を図 3-41 に示す。下流でも血球が整列して流れており、血液の上下の流れ幅や流路底面を転がるように流れる血球もないことが確認できた。

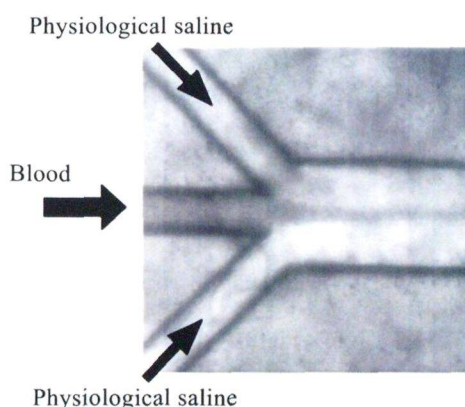


図 3-39 2段階合流流路の三又構造流路の合流位置における血液の流れ

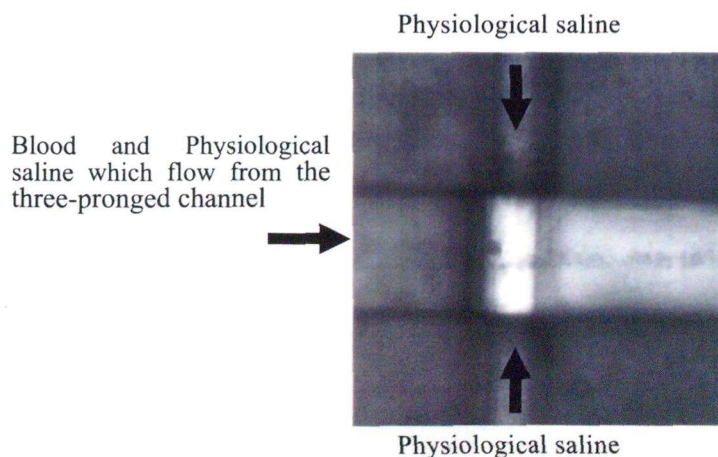


図 3-40 2段階合流流路の上下方向流路の合流位置における血液の流れ

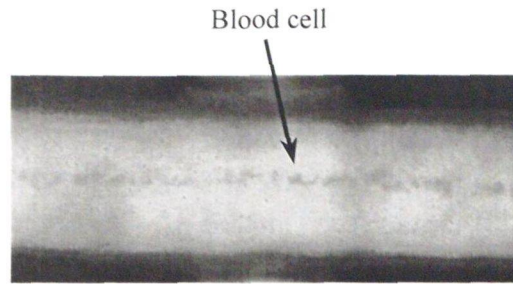


図 3-41 2段階合流流路の下流部における血球整列

3.5 フッ素樹脂を用いた血球変形能観察用マイクロ流体デバイス

3.5.1 擬似毛細血管流路とマイクロ流体デバイスの作製

赤血球変形能を観察することを目的として、微小穴を擬似毛細血管の流路に応用し、図 3-42 に示す模式図のように擬似毛細血管流路を流れる血球の変形状態を観察することを試みた。毛細管流路は血球が変形しながら流れるような流路の直径であるため閉塞してしまう可能性や、血液が流れるためタンパク質などで流路壁面が汚れることによって、さらに毛細管流路が閉塞してしまう可能性がある。そこで撥水性、耐薬品性、光透過性に優れたフッ素樹脂をマイクロ流体デバイスの材料に使用した。2.4 節で述べたフッ素樹脂へのマイクロ加工技術の検討結果をもとに、本節ではフッ素樹脂にダイキン工業(株)製ネオフロン EFEP を使用した。はじめに、赤血球の直径が $8\mu\text{m}$ であるため、それ以下の開口径を有する微小穴を加工した。図 3-43 は厚さ $100\mu\text{m}$ の EFEP フィルムに、波長 193nm 、フルエンス $12\text{J}/\text{cm}^2$ と $7.5\text{J}/\text{cm}^2$ 、集光によるビームの最小直径 $17\mu\text{m}$ の条件で加工した貫通穴の

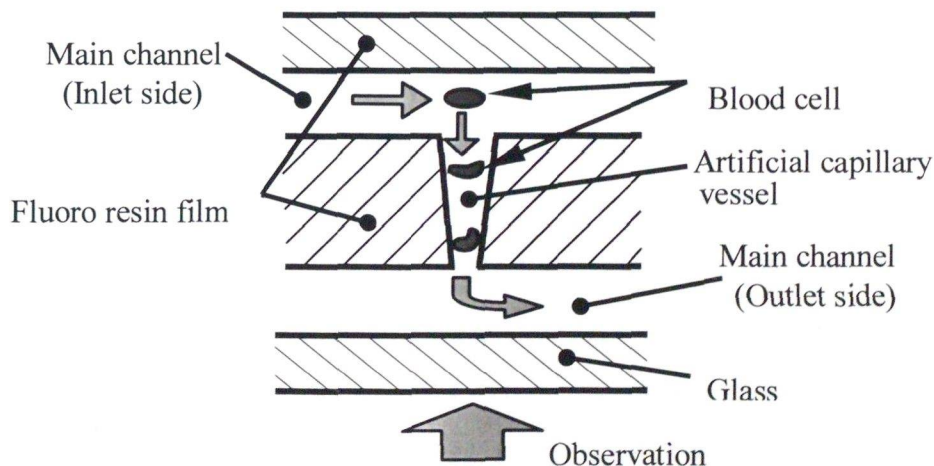


図 3-42 変形によって擬似毛細血管流路を通過する赤血球の模式図

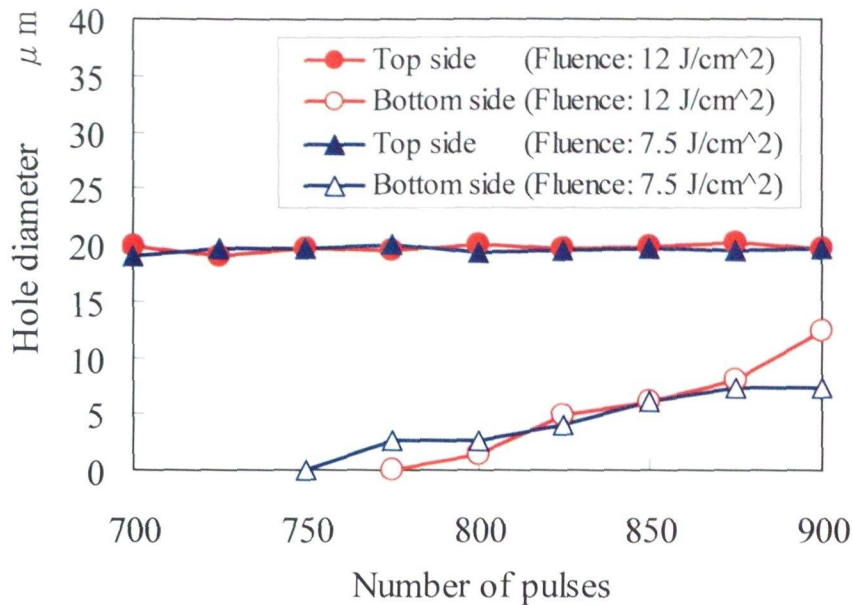
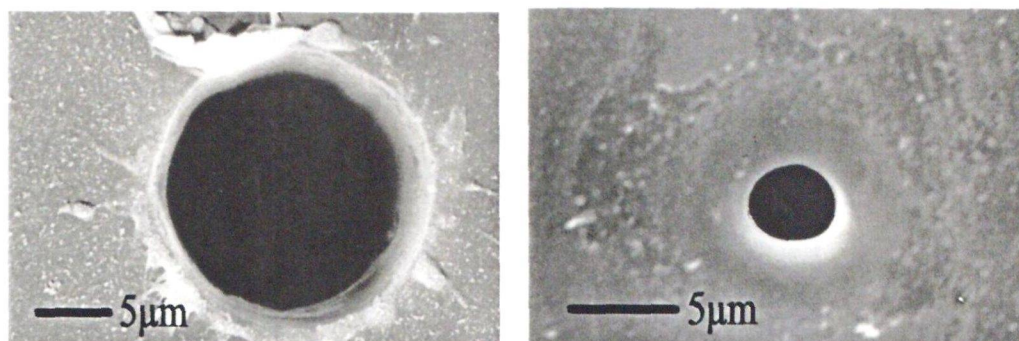


図 3-43 フッ素樹脂へのレーザー加工における穴直径とレーザー照射パルス数との関係

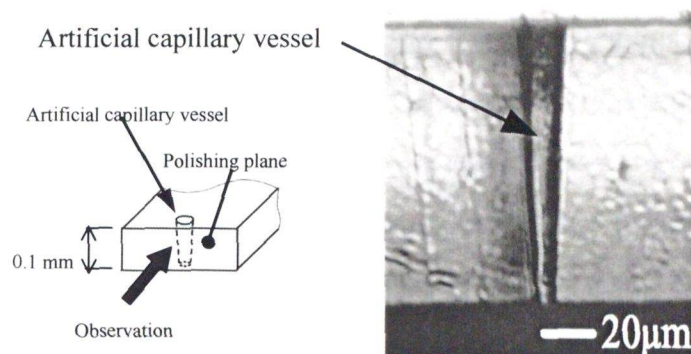
直径と照射回数との関係を調べた結果である。レーザー照射側の穴直径は加工条件を変化させても約 $20\text{ }\mu\text{m}$ 前後ではほぼ一定あり、実験を行った加工条件内では照射回数やフルエンスの影響は小さいことがわかった。一方、レーザー出射側の穴直径は、実験を行った加工条件内では照射回数が増加するほど直径が大きくなることがわかった。この結果をもとに、フルエンス $7.5\text{J}/\text{cm}^2$ 、照射回数 825 パルス、ビーム直径 $17\text{ }\mu\text{m}$ の条件で加工した貫通穴の SEM 観察写真を図 3-44 に示す。図 3-44 (a) はレーザー照射側、(b) はレーザー出射側から観察した結果であり、レーザー出射側の穴直径は $5\text{ }\mu\text{m}$ 以下である。また、フィルム端部の近傍に穴を加工した後に、フィルム側面を研磨加工し、穴の側方から顕微鏡で観察した写真を図 3-45 に示す。貫通穴は直線的なテーパ形状である。また、穴を軸方向に切断した後に穴の側面、すなわちレーザー加工面を観察した SEM 写真を図 3-46 に示す。このレーザー加工面の表面粗さを Zygo 社製の非接触表面形状測定機 NewView6300 によって測定した結果は、 $0.09\text{ }\mu\text{mRa}$ 、 $1.1\text{ }\mu\text{mRy}$ であった。SEM 観察像でも、穴側面の加工面において $1\text{ }\mu\text{m}$ 以上の凹凸は見られず、目標とした赤血球の直径の $1/10$ に近い値まで表面をなめらかにすることができ、血球流れへの影響は少ないと考えられる。入口の直径が $20\text{ }\mu\text{m}$ 、出口の直径が $5\text{ }\mu\text{m}$ 、長さが $100\text{ }\mu\text{m}$ の擬似毛細血管流路としてこの微小穴を利用する。



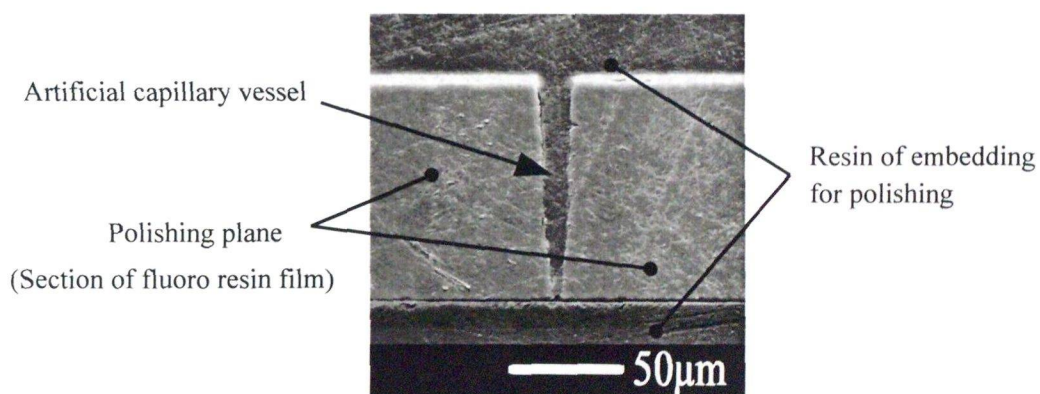
(a) レーザ照射側

(b) レーザ出射側

図 3-44 レーザで加工した微小穴(擬似毛細血管流路)のSEM観察写真



(a) フィルム端部の近傍に加工された微小穴をフィルム側面から観察



(b) 埋込用樹脂と研磨加工によって微小穴の断面形状を観察

図 3-45 フィルムにレーザで加工した微小穴(擬似毛細血管流路)の側面を観察した写真

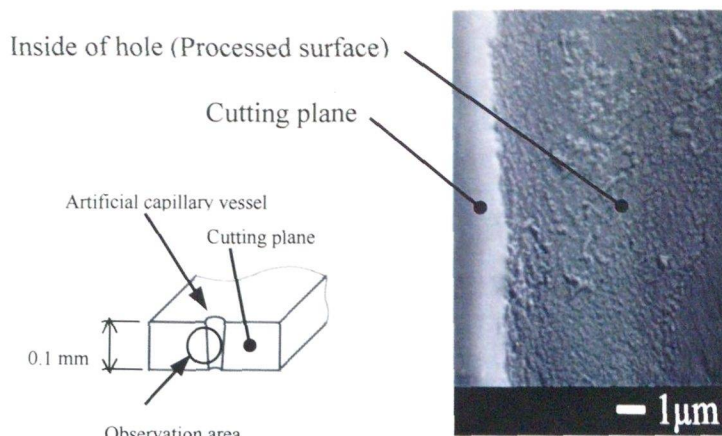


図 3-46 レーザで加工した微小穴の加工面(擬似毛細血管流路の内壁面)の
S E M観察写真

次に、入口の直径が $20\ \mu\text{m}$ で、出口の直径が $5\ \mu\text{m}$ に加工した微小穴を一行に 20 個並べ、これらの微小穴を長さ $100\ \mu\text{m}$ の擬似毛細血管流路として利用し、赤血球変形能を観察することを目的とした立体流路を作製した。図 3-47 にマイクロ流体デバイスの概略図を示し、図 3-48 に立体流路の概略図を示す。表 3-8 に熱硬化性ラミネートフィルムの加工条件を示す。幅 $100\ \mu\text{m}$ 、高さ $45\ \mu\text{m}$ の矩形断面の流路(主流路)を形成する層には厚さ $45\ \mu\text{m}$ のポリイミドの熱硬化性ラミネートフィルムを用い、擬似毛細血管流路を形成する層には厚さ $100\ \mu\text{m}$ のフッ素樹脂フィルム EFEP を用いた。4 層目には、血液送液実験での光学顕微鏡による観察を考慮し、光の透過性がよいフッ素樹脂フィルムを用いた。また、毛細管流路と主流路との間で流路の断面積が急激に変化することによって、液体を流路に注入する時に流路内に存在する空気が気泡となって残留すると考えられるため、血球が擬似毛細血管流路に流入する側の主流路の終端部に気泡抜き用の出口穴を設けた。主流路内の気泡が排出された後は気泡抜き用の出口穴は封止した。さらに、擬似毛細管流路から主流路へ流出する時に、擬似毛細血管流路の出口付近で流体が滞留して血球の付着や詰まりが発生する問題が考えられる。そこで、血球が擬似毛細血管流路から流出する側の主流路の上流部につながる補助流路を設け、この補助流路に生理食塩水を送液し、擬似毛細血管流路から流出した血液とともに出口穴から外部へ流出させる構造とした。これは、擬似毛細血管流路の出口周辺において下流に向かう流れを増加させることによって、擬似毛細血管流路の出口付近での血球の付着を抑制することを目的としている。図 3-49 (a)は血液が流入する側の矩形断面流路と擬似毛細血管流路の S E M観察写真であり、図 3-49 (b)は血液が流出する側の矩形断面流路と擬似毛細血管流路の S E M観察写真である。

表 3-8 熱硬化性ラミネートフィルムの加工条件

| | |
|---------|--|
| 加工装置 | Exitech 社製エキシマレーザ加工機 PS2000 LAMBDA PHYSIK 社製発振機 LPX200i |
| レーザ波長 | 248 nm |
| 縮小光学系倍率 | 10 倍レンズ系 |
| 発振エネルギー | 150 mJ |
| フルエンス | 0.75 J/cm^2 |
| 発振周波数 | 100 Hz |
| ビーム形状 | $108 \mu\text{m} \times 108 \mu\text{m}$ |

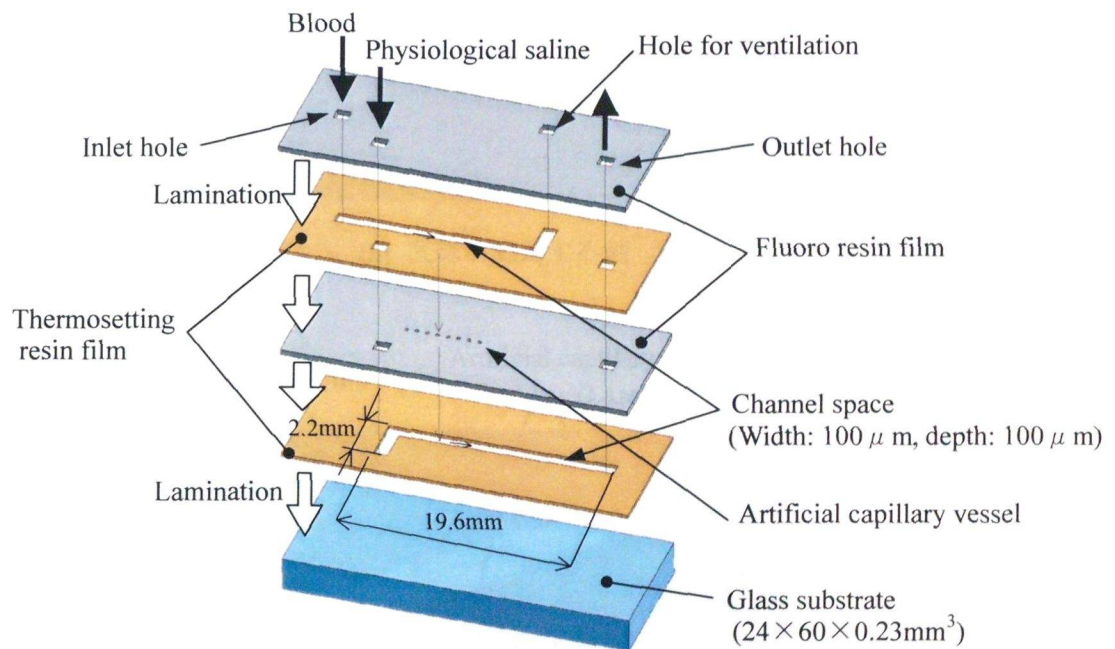


図 3-47 赤血球変形能観察用マイクロ流体デバイスの概略図（展開図）

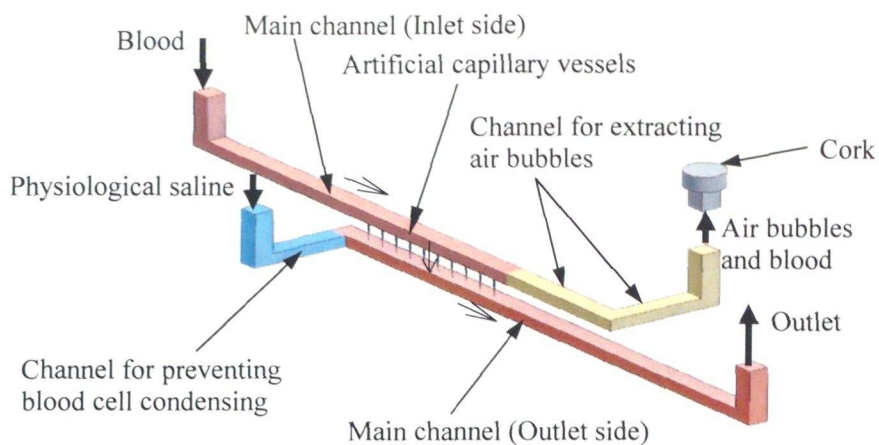
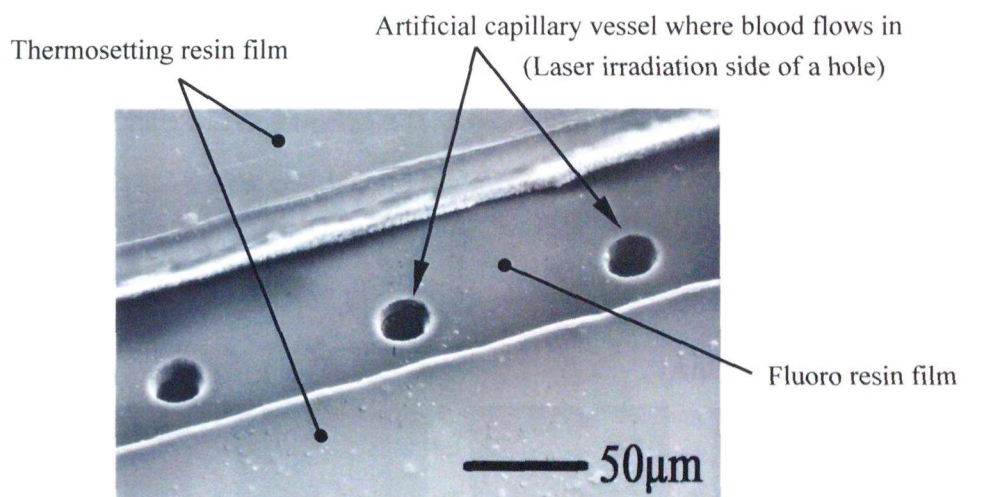
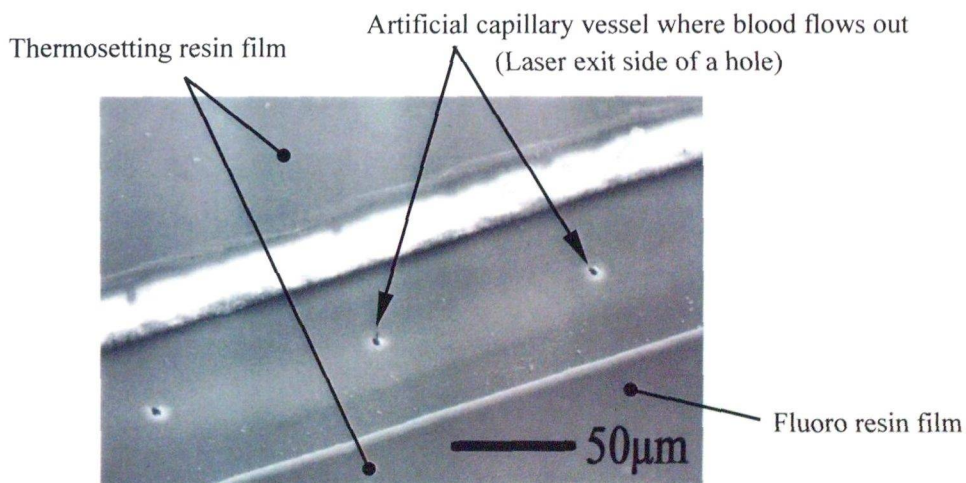


図 3-48 赤血球変形能観察用マイクロ流路の概略図



(a) 血球が流入する側



(b) 血球が流出する側

図 3-49 作製した擬似毛細血管流路と主流路のSEM観察写真

3.5.2 血液を用いた送液実験と赤血球変形能の観察

前節で述べたマイクロ流体デバイスに、2本のシリンジポンプによって液体をマイクロ流路に送液し、光学顕微鏡に取り付けた高速度ビデオカメラで流路内の血球の流れを観察した。生理食塩水で20倍に希釈した自己血を主流路に送液した。さらに、毛細管流路から血液が流出する側の矩形断面流路(主流路)につながる補助流路へ生理食塩水を送液した。流路内の気泡は、気泡抜き用の出口穴から排出することができた。そして、流路内の気泡が排出された後は気泡抜き用の出口穴は封止した。血球凝集防止用の補助流路から流れる生理食塩水の効果によって、擬似毛細血管流路の出口付近における血球の付着は発生しなかった。補助流路から生理食塩水を流さない場合は擬似毛細血管流路の出口付近で血球の付着や詰まりが発生したため、補助流路からの送液の効果が大きいことが確認できた。図3-50は血球が擬似毛細血管流路に流れ込む時の連続観察写真であり、図3-51は血球が擬似毛細血管流路から流れ出る時の連続観察写真である。直径約 $8\mu\text{m}$ の赤血球が出口直径 $5\mu\text{m}$ の擬似毛細血管流路を詰まることなく通過することが確認できた。

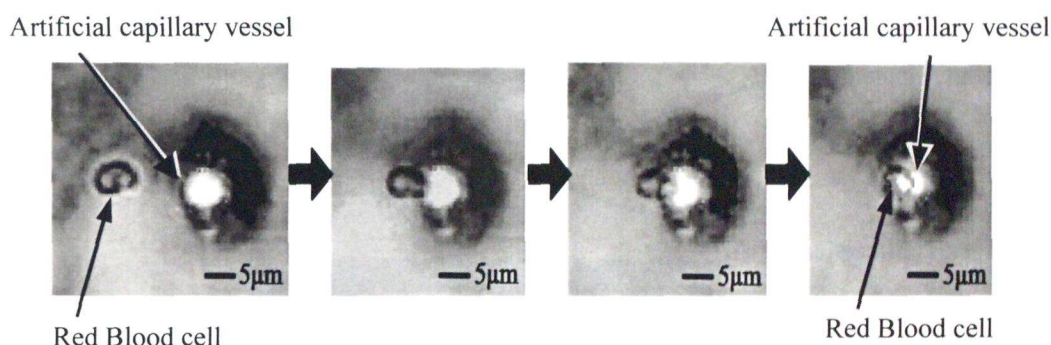
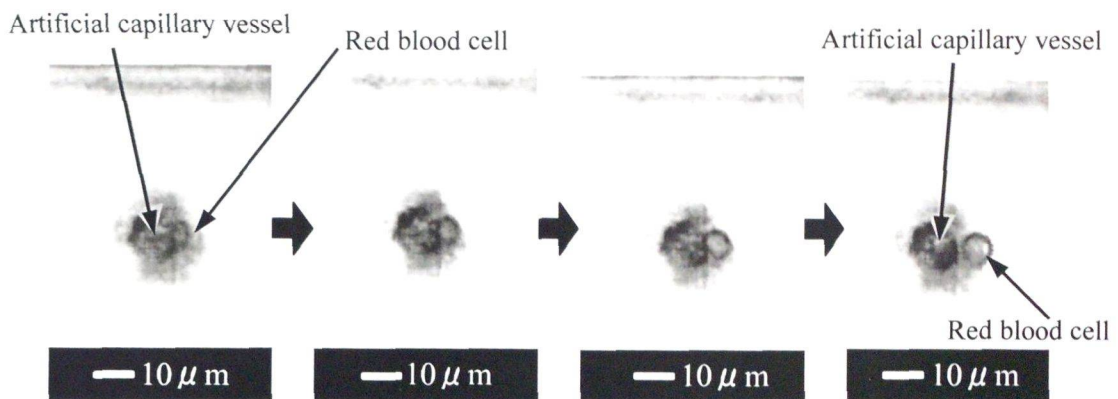
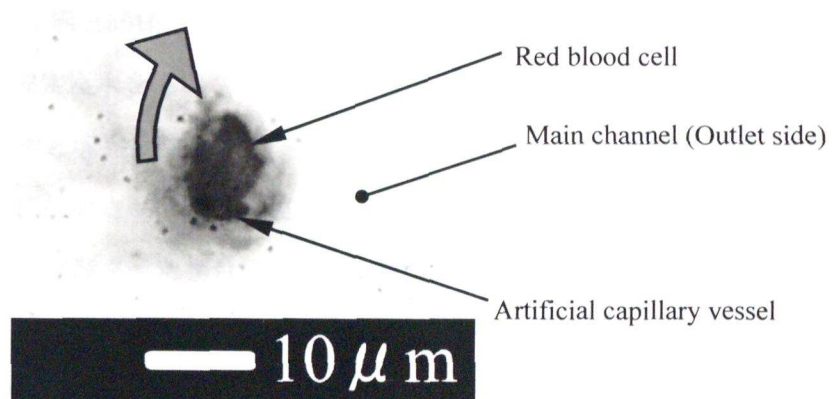


図 3-50 擬似毛細血管流路へ流入する血球の連続観察写真



(a) 流出する血球の連続観察写真



(b) 流出する瞬間の血球

図 3-51 擬似毛細血管流路から流出する血球の観察写真

3.6 重力を利用した流体駆動方法

3.6.1 接続チューブの高低差による流体駆動と血球整列

A. 流体解析による流路の設計

マイクロ流体デバイスは前述のように小径チューブを取り付け、そのチューブを介してシリンジなどの流体駆動部と結合する構成である。しかし、この構成ではシリンジやシリンジポンプなどの駆動機器が必要である。これまでに研究されている μ T A S では、流路などを形成するチップは非常に小さいが、対照的にポンプや接続チューブのように周辺装置は非常に大型であるという課題がある。そこで、図 3-52 の概念図に示すように、内径 0.5mm のシリコンチューブ内に試料を充填させ、チューブ端部の位置をチップの高さよりも上方にすることによって、小径チューブ内の試料に加わる重力を駆動源として液体の送液が可能かを調べた。はじめに、C A E による流体解析を用いて、3.2 節で述べた三又構造マイクロ流路をもつマイクロ流体デバイスを使用した場合について、液体の流れの状態を予測した。

主な解析条件を表 3-9 に示す。流体解析ソフトは 3.3.1 節と同様なソフトを使用した。また、流体の物性値も 3.3.1 節と同様な値を使用した。三又構造の中央の支流路に血液を充填し、両側の支流路に生理食塩水を充填させた場合を解析した。図 3-53 に流体解析に用いた三又構造流路のモデル図と境界条件を示す。血液用の小径チューブおよびリザーバーをチップから高さ 200mm に位置させ、生理食塩水用の小径チューブおよびリザーバーをチップからの高さ 400mm に位置させた場合について、チューブ内の液体に加わる重力によってマイクロ流路の入り口に加わる圧力を計算して境界条件とした。また、出口面の圧力はゼロすなわち大気開放の境界条件を設定した。要素分割では、合流位置周辺では要素寸法を $5\mu\text{m}$ とし、流速変化に対応できるように分割した。

流体解析を行った解析結果について、図 3-54 に三又流路が合流する位置における流線とその流速を示し、図 3-55 に流速ベクトル図を示し、図 3-56 に合流位置における圧力分布図を示す。図 3-54 に示すように三又構造マイクロ流路の合流位置で血液の流れ幅が $13\sim 14\mu\text{m}$ に絞られ、また図 3-55 に示すように合流位置での血液の流れ中心における流速は $5\sim 6\text{ mm/s}$ となる解析結果となった。この解析結果から、小径チューブ内の液体に加わる重力を利用するだけでマイクロ流路内の液体を送液できる可能性が示された。また、チューブおよびリザーバーの高さを調節することによって、三又構造流路の合流位置で血液の流れ幅が絞られる可能性が示された。

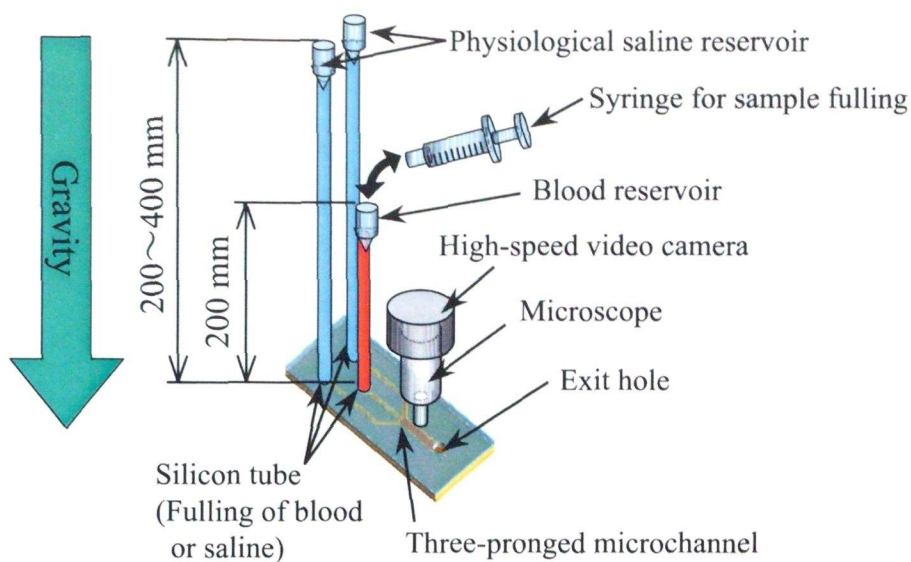


図 3-52 チューブ高低差による重力駆動用マイクロ流体デバイスの概念図

表 3-9 チューブ高低差による重力駆動用三又流路の流体解析条件

| | |
|-------------|--|
| 流体解析ソフト | ANSYS-CFX Ver10.0 |
| 要素分割ソフト | ANSYS Ver10.0 |
| 流体物性値 | 密度： $1.06 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ |
| | 粘性係数： $4.71 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ |
| 要素分割サイズ | $5 \text{ }\mu\text{m}$ (流路軸方向 $200 \text{ }\mu\text{m}$) |
| 要素の種類 | 6 面体要素 |
| | 壁面近傍：プリズム要素 (3 層) |
| 流路断面形状と境界条件 | 血液入口断面： $0.05\text{mm} \times 0.045\text{mm}$ |
| | 圧力： 2058 Pa (高さ 200 mm 相当) |
| | 生理食塩水入口断面： $0.05\text{mm} \times 0.045\text{mm}$ |
| | 圧力： 4018 Pa (高さ 400 mm 相当) |
| | 出口断面： $0.15\text{mm} \times 0.045\text{mm}$ |
| | 圧力： 0 |

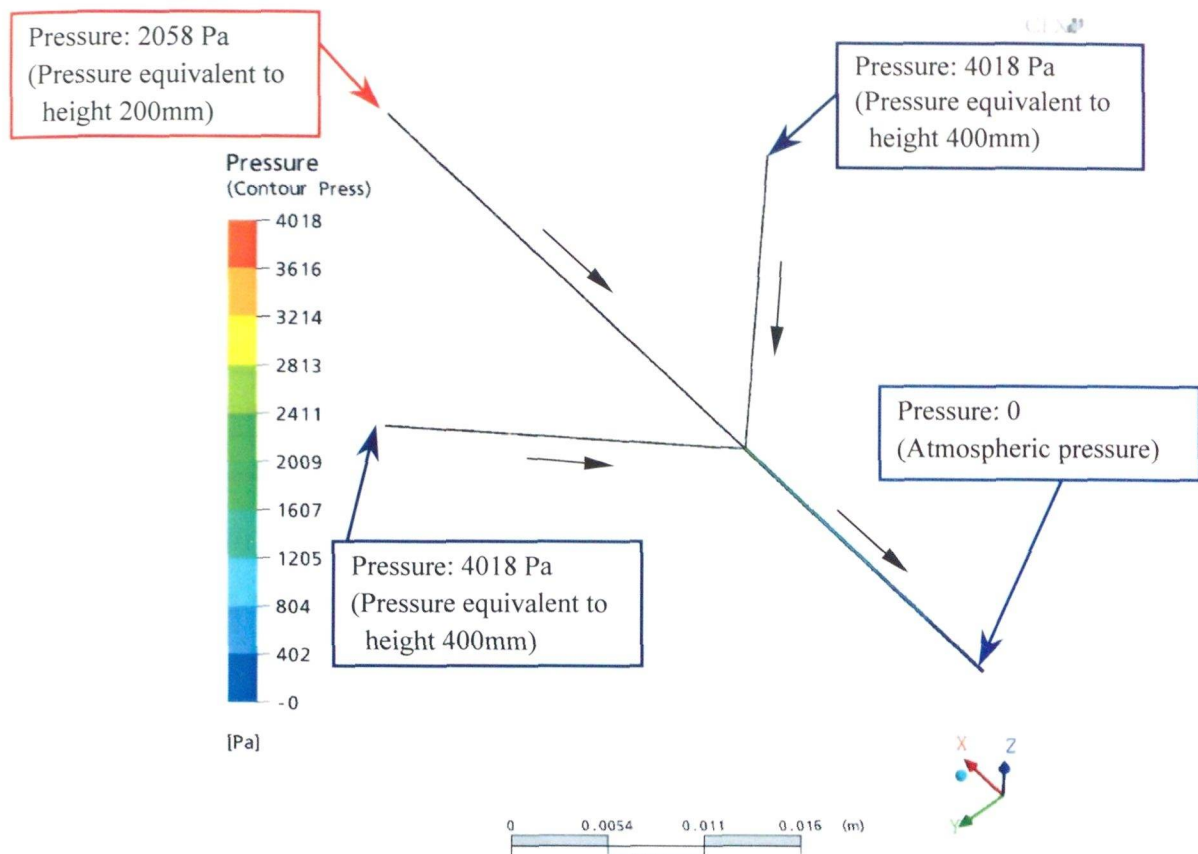


図 3-53 流体解析に用いた三又構造流路のモデル図と境界条件

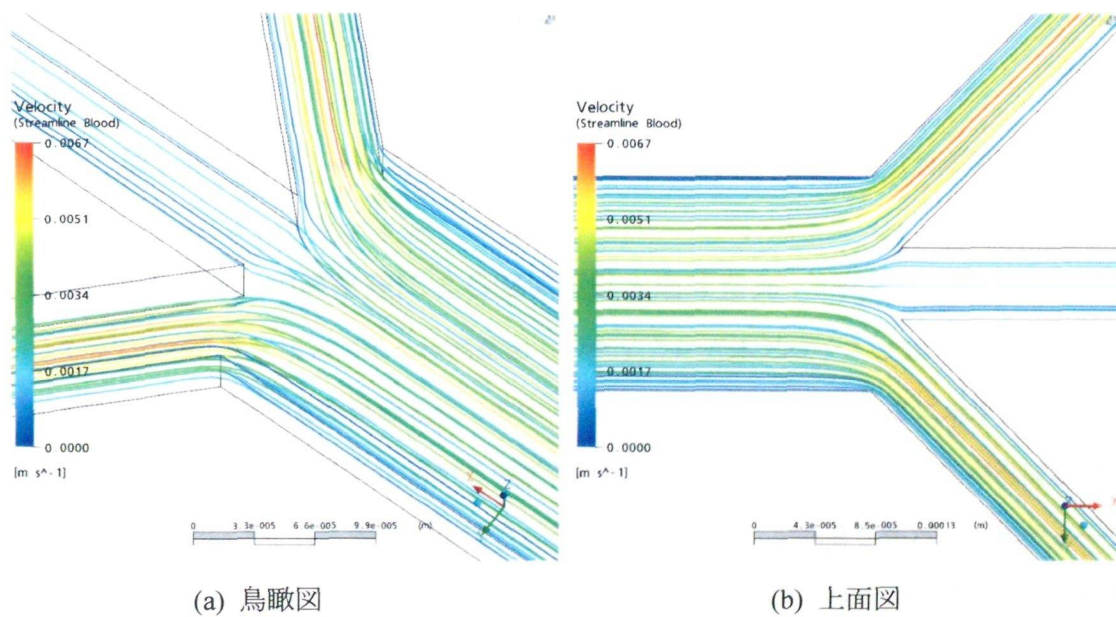


図 3-54 合流部分における流線と流速を表示した流体解析結果

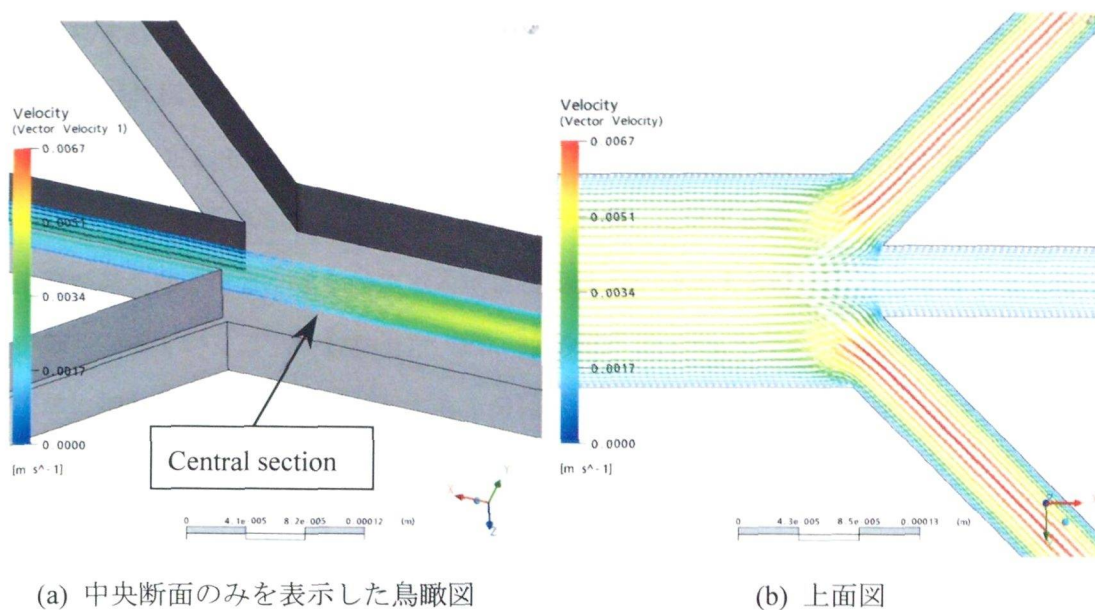


図 3-55 合流部分における流速ベクトルを表示した流体解析結果

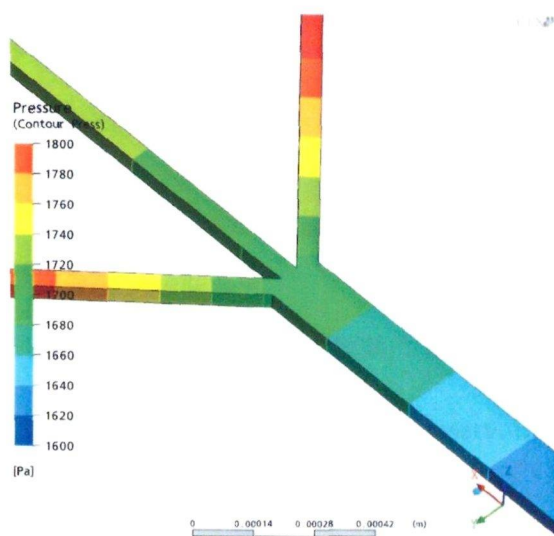


図 3-56 合流位置における圧力分布を表示した流体解析結果（鳥瞰図）

B. 接続チューブの高低差による流体駆動と血球整列

3.2 節で述べた三又構造マイクロ流路をもつマイクロ流体デバイスを用い、小径チューブ内の試料に加わる重力を駆動源として液体の送液実験を行った。図 3-52 に示すように、三又構造の中央の支流路とそれに繋がる小径チューブに生理食塩水で希釈した自己血を充填し、両側の支流路とそれに繋がる小径チューブに生理食塩水を充填させた。小径チューブおよびリザーバをチップよりも上方に位置することによって、小径チューブやリザーバ内の試料に加わる重力によって、流路内の液体を駆動することができた。さらに、血液を充填したリザーバや小径チューブの高さよりも生理食塩水を充填したリザーバなどの高さを

上方にすることによって、図 3-57 に示す三又流路の合流位置における観察結果のように、血液の流れ幅を絞ることができた。次に、血液を充填したリザーバをチップからの高さ 200mm に固定して、生理食塩水を充填したリザーバーの高さを変化させた場合の赤血球の流速変化と、絞られた血液の流れ幅の変化を測定した結果を図 3-58 に示す。生理食塩水的位置が高くなるほど、すなわち重力による駆動力が増加するほど、流速は早くなり流れ幅が細くなっていくことがわかった。また、流路幅が 0.15mm では約 16mm/sec の流速になり、液体に加わる重力を駆動源としても十分に送液できることが確認できた。

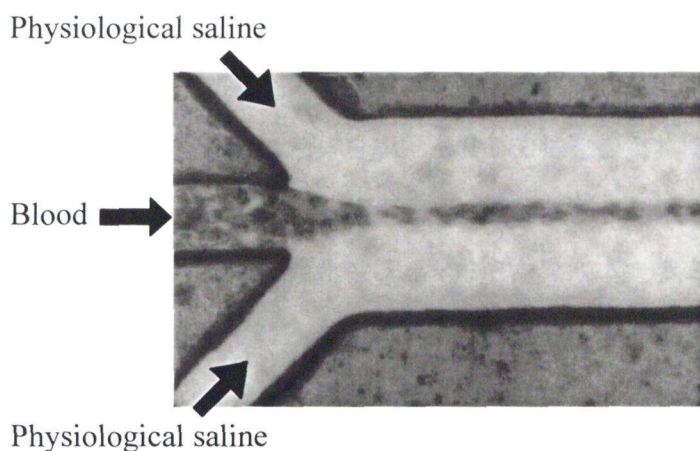


図 3-57 三又構造流路における重力駆動による送液実験結果

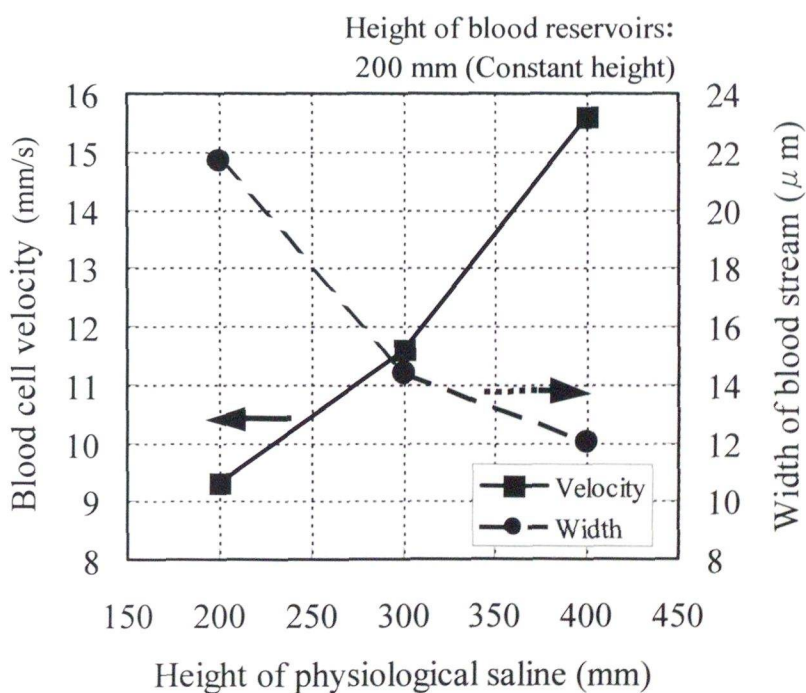


図 3-58 リザーバ高さに対する流速および血液の流れ幅との関係

3.6.2 重力駆動部集積型マイクロ流体デバイスの作製

A. 作製方法と実験方法

前節では三又構造の流路をもつマイクロ流体デバイスなどを作製し、チップに繋がれた送液用の小径シリコンチューブ内の液体に加わる重力を利用して液体を駆動する方法を検討した。しかし、この場合はシリンジやシリンジポンプなどの駆動機器は必要ないが、送液用チューブが必要であり、チップに比べて非常に長いという課題がある。これまでに研究されている μ T A S では、流路などを形成するチップは非常に小さいが、対照的にポンプや接続チューブのように周辺装置は非常に大型であるという課題がある。そこで、送液用チューブを使用せずに、チップ表面に加工された流路入口穴の部分に液溜め用リザーバを設け、液溜め用リザーバを上方にしてチップを垂直な状態にすることによって、流路内の液体に加わる重力を利用して流体を駆動させる方法を提案し検討した。

レーザによる重力駆動用マイクロ流体デバイスの作製プロセスを図 3-59 に示す。はじめにカバーガラスにポリイミドの熱硬化性ラミネートフィルムをラミネート接着し（図 3-59 (1)）、レーザ加工によって樹脂部分に微細溝と穴を形成する（図 3-59 (2)）。多層化させる場合は、樹脂フィルムをラミネート接着し、レーザ加工によって溝などを形成することにより多層化させる。最後に樹脂フィルムをラミネート接着して覆い（図 3-59 (3)）、液溜め用のリザーバ部品を接着する（図 3-59 (4)）。

送液実験では図 3-60 に示すように、マイクロ流路の入口に接着された液溜め用リザーバに、血液や生理食塩水を注入した。実験で用いた血液は、抗凝固薬を混ぜ生理食塩水で希釈した自己血である。流路は生理食塩水が充填されている状態である。液溜め部は大気開放されている。さらに、図 3-60 に示すように、液溜め用リザーバを上方にしてチップを垂直な状態にし、重力駆動による送液実験を行った。送液実験では血液と生理食塩水は出口穴から外部へ流出させた。また、血液の流れや血球の状態は、光学顕微鏡に取り付けた高速ビデオカメラを用いて観察を行った。作製した重力駆動用マイクロ流体デバイスの外観写真を図 3-61 に示す。

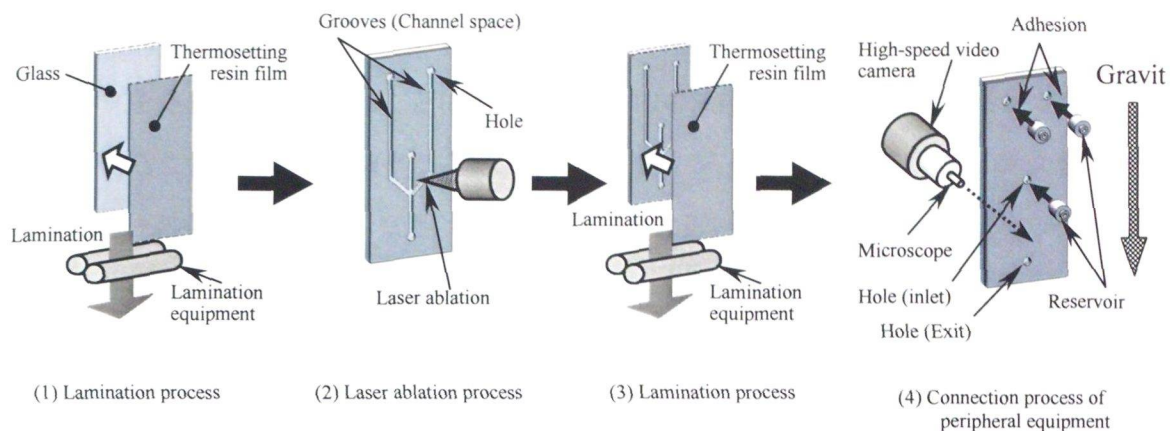


図 3-59 重力駆動用マイクロ流体デバイスの作製プロセス

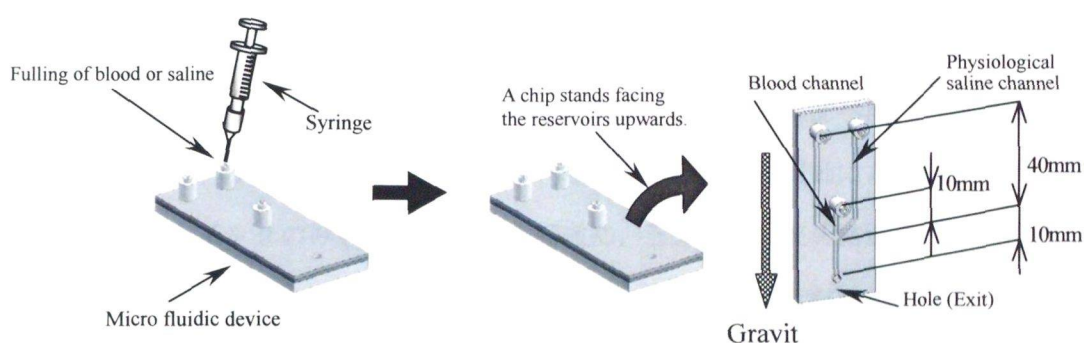


図 3-60 重力駆動用マイクロ流体デバイスを用いた送液実験の概略図

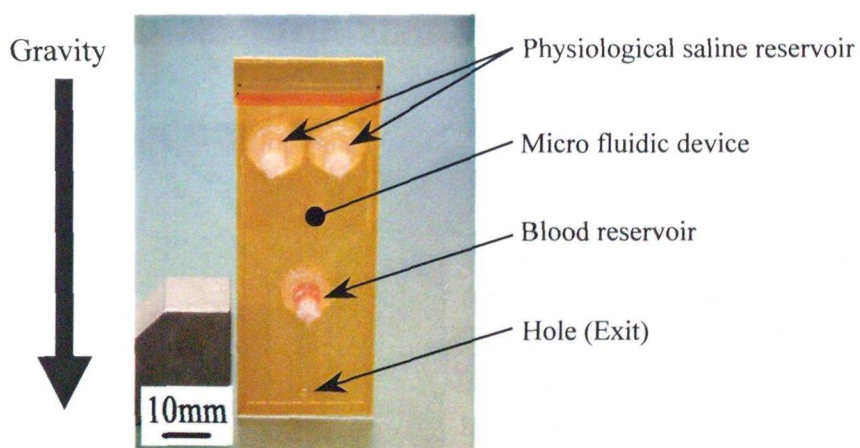


図 3-61 重力駆動用マイクロ流体デバイスの外観写真

B. 小径ビーズとインクを用いた予備実験の結果および考察

送液用チューブを使用せずに、チップ表面に加工された流路入口穴の部分に液溜め用リザーバを設けた重力駆動用マイクロ流体デバイスを使用し、液溜め用リザーバを上方にしてチップを垂直な状態にすることによって、流路内の液体に加わる重力を利用して流体を駆動させることが可能かを調べた。実験では、インクジェットプリンタ用のインクを純水で希釈した液体を使用した。また、赤血球の大きさに近い外径 $10\mu\text{m}$ の小径ラテックスビーズを使用した。流路構造および流路断面形状は 3.2 節で述べた三又構造マイクロ流路である。加工条件は 3.2.1 節で述べた三又構造マイクロ流路をもつマイクロ流体デバイスを作製する条件と同様である。三又構造マイクロ流路の中央支流路の入口に接着された液溜め用リザーバに、インクのみを注入した場合または小径ビーズを拡散させたインクを注入した場合についてそれぞれ実験した。また、両サイドの支流路の入口に接着された液溜め用リザーバに純水を注入した。流路ははじめに純水が充填されている状態である。

重力駆動によるインク送液実験結果を図 3-62 に示す。三又構造の支流路が合流した位置で中央のインクの流れ幅が絞られていることが確認できた。下流部へ流れるほど液体が拡散していくことがわかった。次に、小径ビーズを使用した重力駆動による送液実験結果を図 3-63 に示す。インクのみを用いた実験と同様に、三又構造の支流路が合流した位置で小径ビーズの流れ幅が絞られることが確認できた。一方、下流部における小径ビーズの拡散は小さいことがわかった。これは純水と小径ビーズの比重が異なるため、重力による小径ビーズの自由落下や沈殿作用が影響していると考えられる。しかし、送液を続けていると小径ビーズがマイクロ流路内に付着・凝集する箇所が発生した。これは小径粒子の凝集効果や小径ラテックスビーズとデバイスのフィルムとが樹脂材料であることが影響している

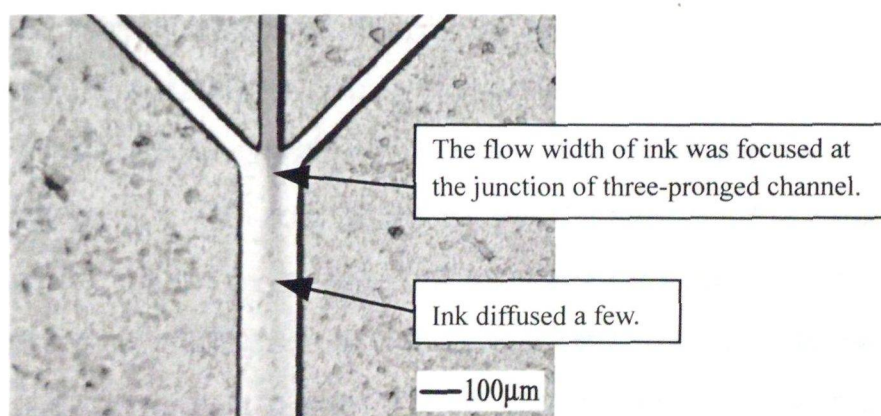
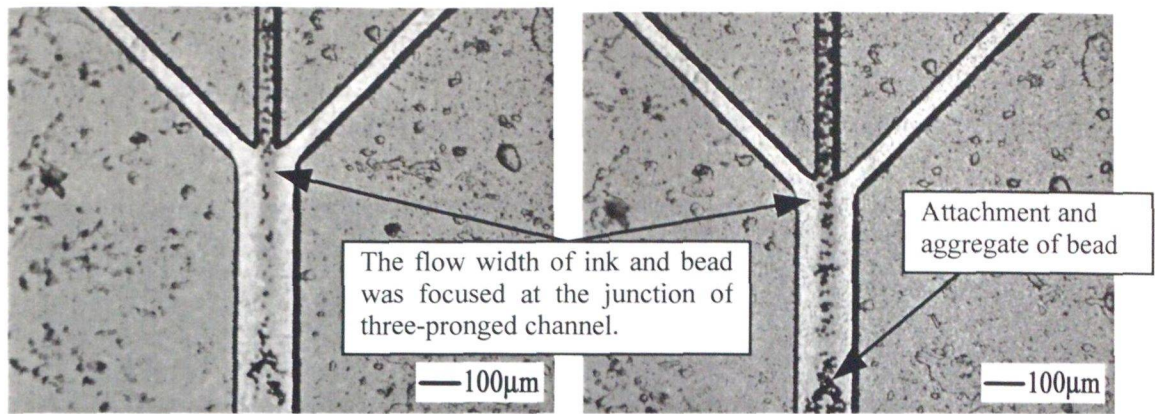


図 3-62 重力駆動によるインク送液実験結果



(a) 小径ビーズ量：少

(b) 小径ビーズ量：多

図 3-63 重力駆動による小径ビーズの送液実験

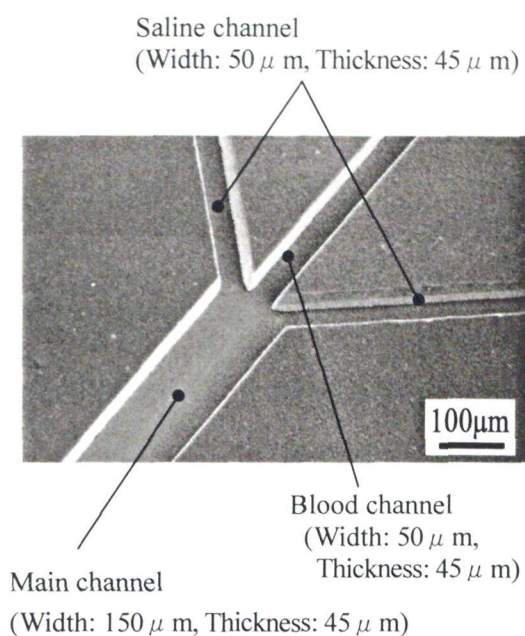
と考えられる。また、小径ビーズの流速は約 0.4 mm/sec であった。流速が速くなれば、合流位置近傍におけるインクの拡散や流路内のビーズの付着の発生も少し抑制できると考えられる。

3.6.3 三又構造マイクロ流路における血球整列と流路形状の最適化

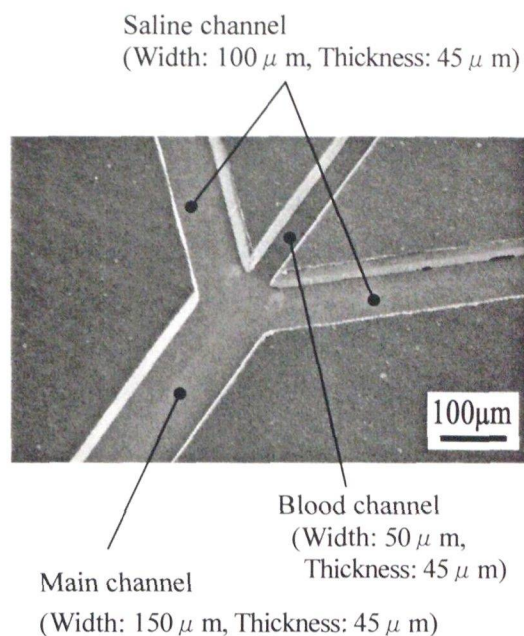
A. 重力駆動による血球整列と流路幅寸法との関係

ここでは、三又流路の流路幅が合流部の流れの状態に及ぼす影響について調べた。図 3-64 に示すように、流路の幅を 50~150 μm に変化させた 4 種類の流路形状のマイクロ流体デバイスを作製した。図 3-65 に示すように、血液用の支流路の長さは 10mm で、生理食塩水用の支流路の長さは 40mm で、合流した主流路の長さは 10mm である。加工条件は 3.2.1 節で述べた三又構造マイクロ流路をもつマイクロ流体デバイスを作製する条件と同様である。

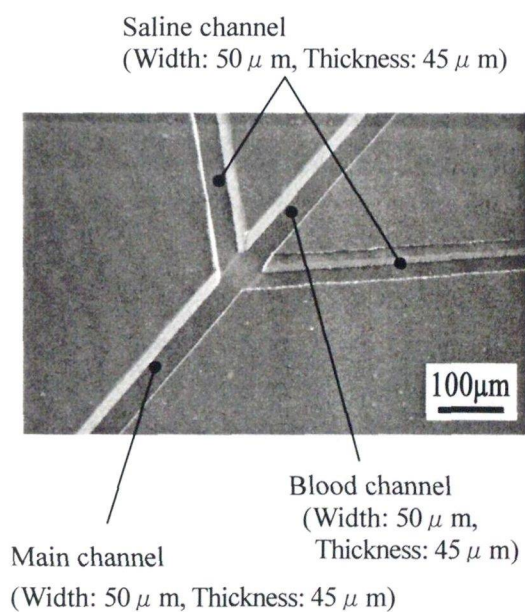
実験では、抗凝固薬を混ぜ、生理食塩水で希釈した自己血を用いた。三又構造の中央支流路とその入口に接着された液溜め用リザーバに、生理食塩水で 10 倍に希釈した血液を充填した。両サイドの支流路とその入口に接着された液溜め用リザーバに生理食塩水を充填した。液溜め部は大気開放されている。次に、液溜め用リザーバを上方にしてチップを垂直な状態にした。液体に加わる重力によって、血液と生理食塩水がマイクロ流路内を流れ、出口穴から外部へ流出することが確認できた。図 3-64 に示す三又構造流路の合流位置を観察した実験結果を図 3-66 に示す。タイプ 1 のマイクロ流路では、生理食塩水の流れによって血液の流れ幅が約 20 μm に絞られた。タイプ 2 のマイクロ流路では、生理食塩水の流れ



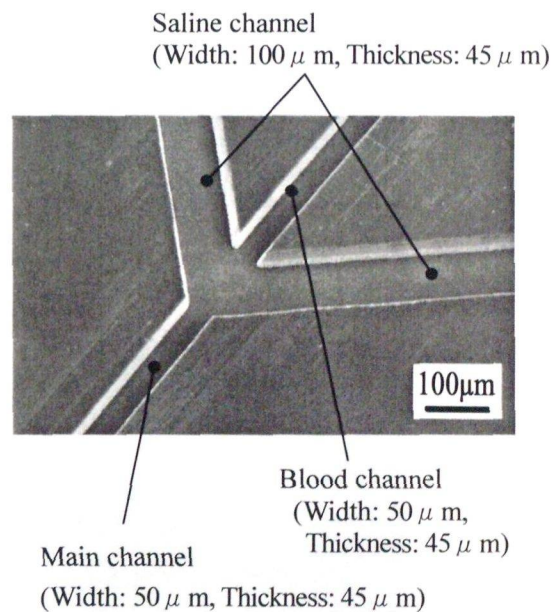
(a) タイプ 1



(b) タイプ 2

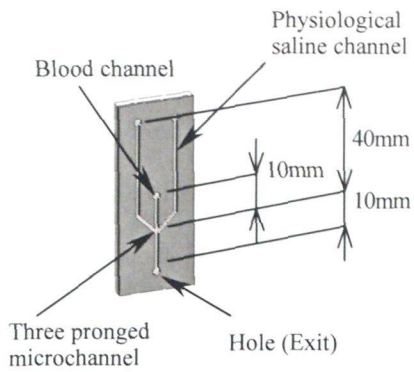


(c) タイプ 3

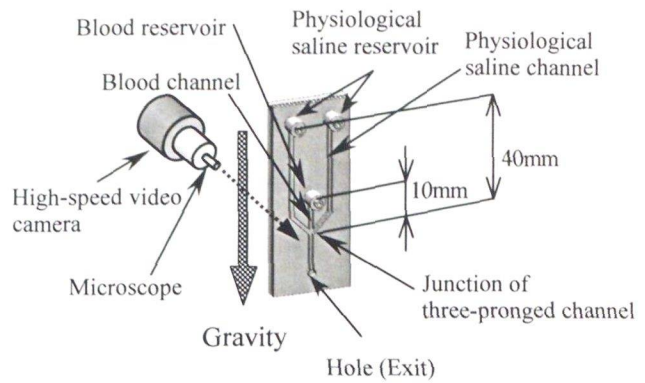


(d) タイプ 4

図 3-64 流路の幅を変化させた 4 種類の三叉構造マイクロ流路

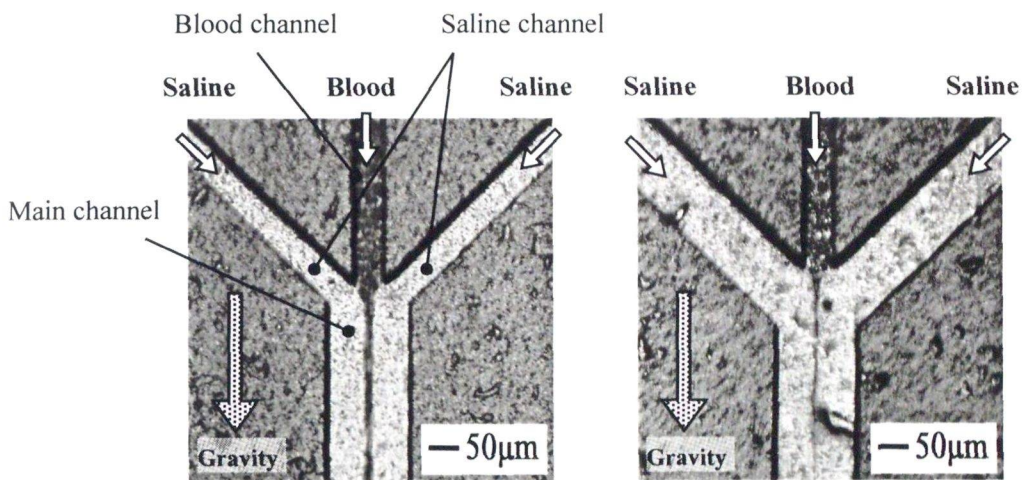


(a) 三又構造マイクロ流路の概略図



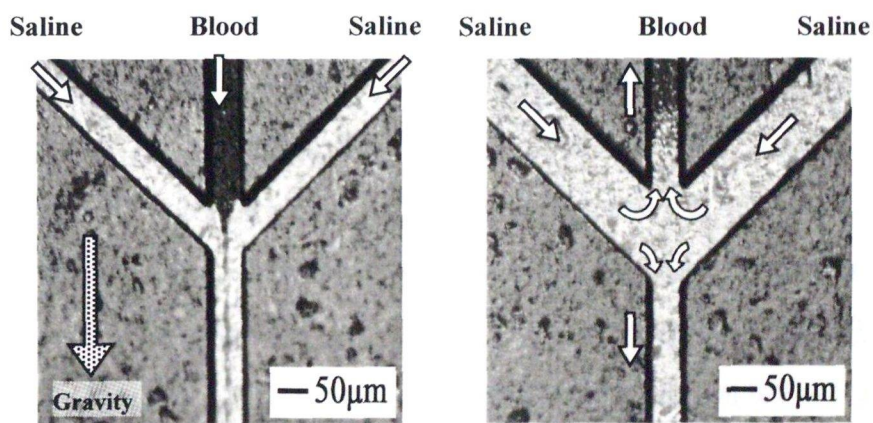
(b) マイクロ流体デバイスと観察方法

図 3-65 重力駆動用マイクロ流体デバイスを用いた送液実験の概略図



(a) タイプ 1

(b) タイプ 2



(c) タイプ 3

(d) タイプ 4

図 3-66 重力駆動による三又構造マイクロ流路の合流位置における血球の流れ.

図 3-64 に示す 4 種類の流路形状のタイプ 1 ~ 4 に対応した実験

によって血液の流れ幅が数 μm に絞られた。しかし、生理食塩水の圧力が非常に強く血液の圧力との差が大きいため、生理食塩水の圧力変動の影響を血液の流れが受けやすく、血液の流れが不安定であった。タイプ3のマイクロ流路では、生理食塩水の流れによって血液の流れ幅が $10\mu\text{m}$ 以下に絞られた。タイプ4のマイクロ流路では、生理食塩水の圧力が非常に強く、さらに合流する主流路の流路断面形状が支流路に対して小さいため、両サイドの支流路から生理食塩水が中央の支流路に流れ込み血液が上方に逆流した。このように、生理食塩水の圧力と血液の圧力との差が血液の流れに影響していると考えられる。そこで、以下の実験ではタイプ3の形状を使用して検討を行った。

B. 重力駆動による血球整列と流路高さとの関係

生理食塩水の圧力と血液の圧力との差が、三又構造流路の合流部における血液の流れに影響していると考えられるため、前節で述べた流路幅の影響とともに、流路の高さの関係も調べた。図 3-67 に示すように生理食塩水用の支流路の長さを $10\sim 40\text{mm}$ に変化させた4種類のマイクロ流体デバイスを作製した。そして、血液溜めのリザーバ（以下は血液用リザーバと記述する）と生理食塩水溜めのリザーバ（以下は生食用リザーバと記述する）の高さの差を変化させた場合の流体の状態を調べた。主流路や支流路の流路幅は、図 3-64 に示すタイプ3と同じ寸法である。実験方法は 3.6.3.A 節と同様である。

リザーバを上方にしてチップを垂直な状態にした。液体に加わる重力によって、マイクロ流路内の血液と生理食塩水を流した。三又構造流路の合流位置を観察した実験結果を図 3-68 に示す。血液用リザーバと生食用リザーバの高さが同じ場合は、合流位置における血液と生理食塩水の流れ幅は、それぞれ平均 $16\mu\text{m}$ 程度であった。生理食塩水用の液溜め部の位置が高くなると、合流位置における生理食塩水の圧力が上昇し、これによって血液の流れ幅は減少した。合流位置における血液の流れ幅と生食用リザーバの位置との関係を調べた結果を図 3-69 に示す。生食用リザーバの高さが 40mm の場合、血液の流れ幅は平均 $7\mu\text{m}$ となった。また、高速度ビデオカメラを使用して血球の移動距離と移動時間を測定し、血球の流速を計算した。合流部における赤血球の最大流速と生食用リザーバの高さとの関係を調べた結果を図 3-70 に示す。生食用リザーバの位置が高くなっていくと、合流部における流速が増加した。しかし、生食用リザーバの高さが 30mm 以上では、血球の最大流速は約 3mm/s で流速の変化量は少ない。したがって、血液用リザーバと生食用リザーバの高さの差が 40mm 以上になると、血液が流路上方へ逆流してしまうことが考えられる。

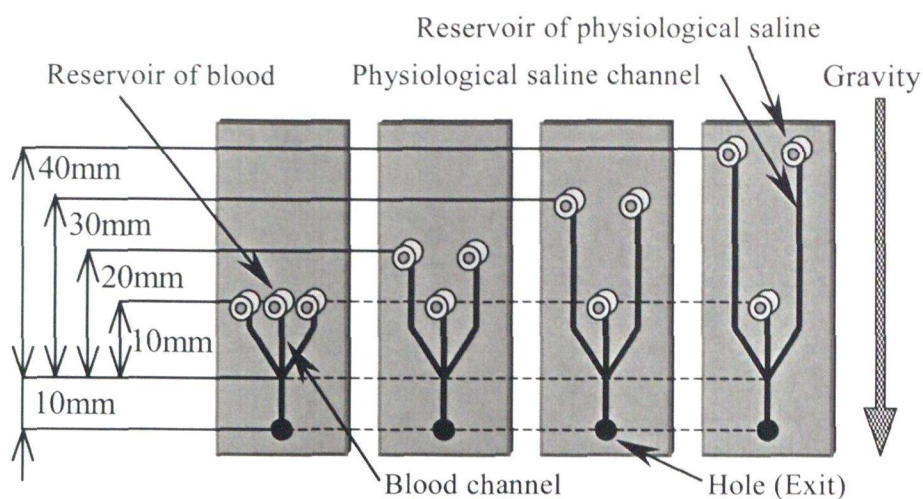


図 3-67 液溜め用リザーバの高さを変化させた 4 種類のマイクロ流体デバイスの概略図

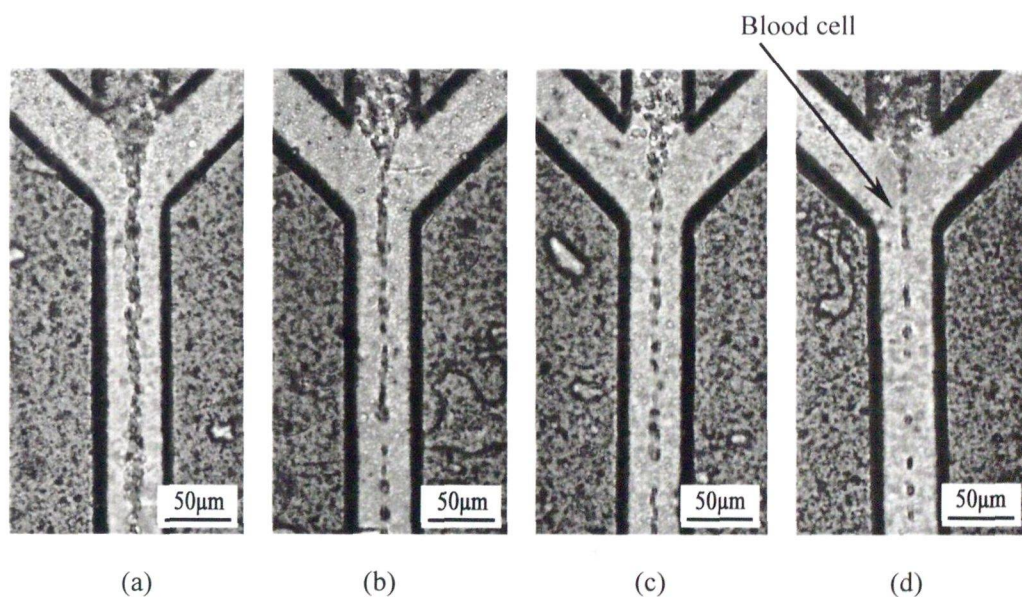


図 3-68 重力駆動による三又構造マイクロ流路の合流位置における血球の流れ

- (a) 生理食塩水の液溜め用リザーバの高さが 10mm.
- (b) 生理食塩水の液溜め用リザーバの高さが 20mm
- (c) 生理食塩水の液溜め用リザーバの高さが 30mm.
- (d) 生理食塩水の液溜め用リザーバの高さが 40mm.

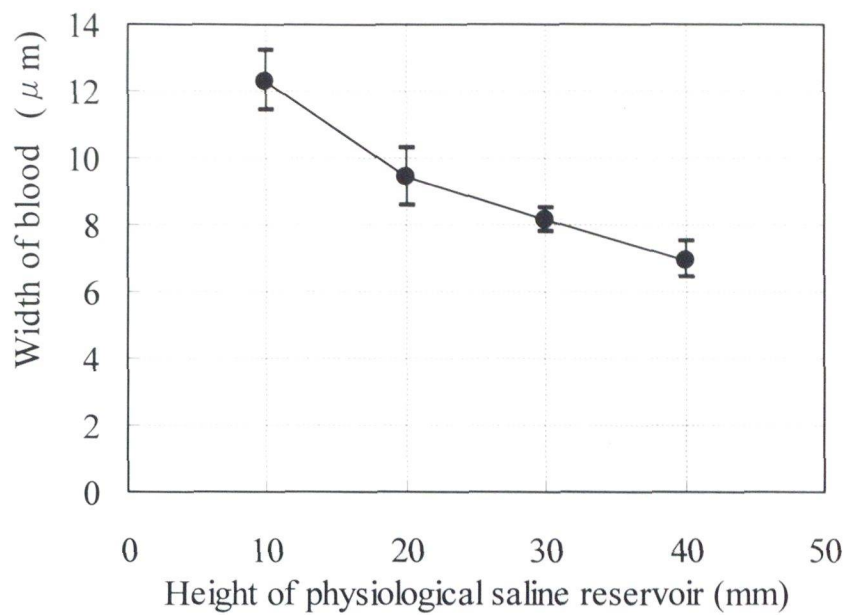


図 3-69 重力駆動による血液の流れ幅と生理食塩水の液溜め用リザーバの高さとの関係

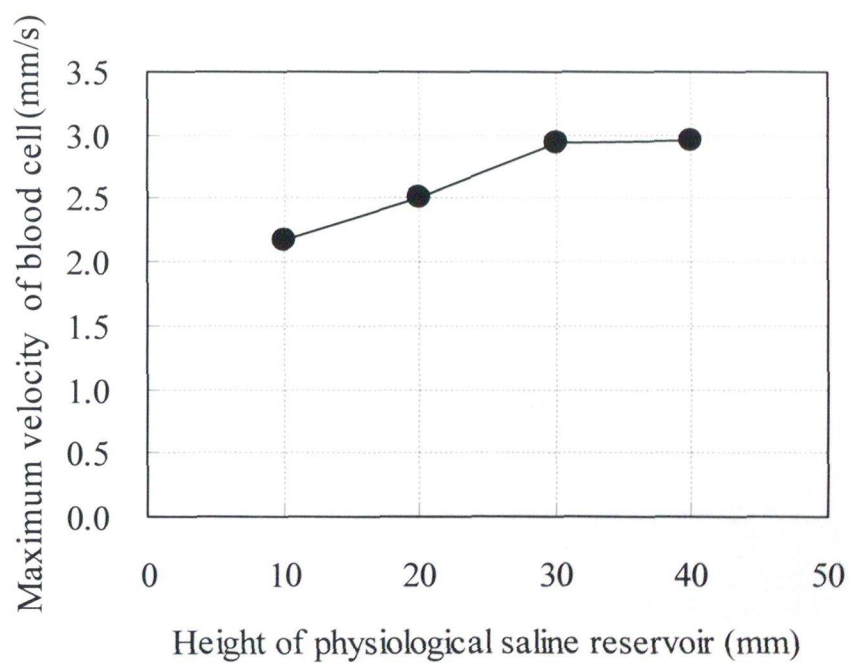


図 3-70 重力駆動による血球の最大流速と生理食塩水の液溜め用リザーバ高さとの関係

3.6.4 小径パイプ流路と重力駆動

A. 作製方法と実験方法

マイクロ流路内の液体に加わる重力を利用して液体を駆動し、さらに血液と生理食塩水の合流部において血液の流れの全周を生理食塩水のシースフローで覆うことを目的として、図 3-71 に示すような小径パイプを挿入した立体流路をもつ重力駆動用マイクロ流体デバイスを作製した。加工条件は 3.3.2 節で述べた小径パイプを挿入したマイクロ流体デバイスを作製する条件と同様である。主流路の寸法を $200\mu\text{m} \times 180\mu\text{m}$ とし、小径パイプが取り

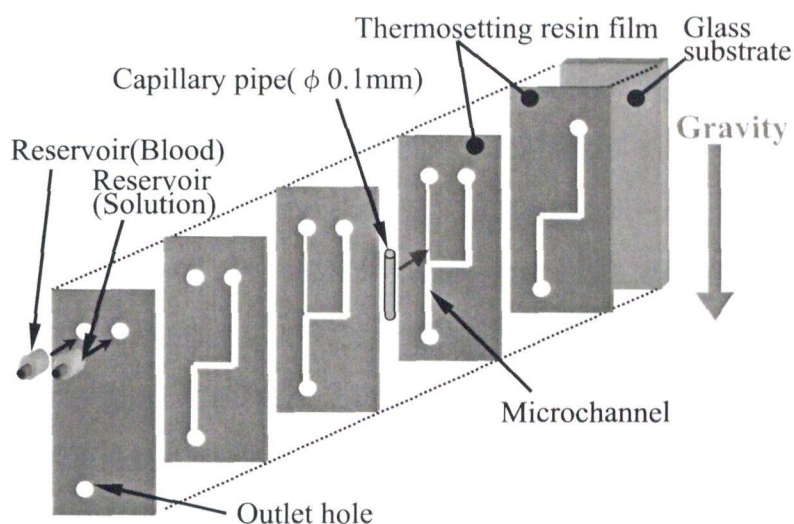


図 3-71 小径パイプを挿入した重力駆動用マイクロ流体デバイスの概略図（展開図）

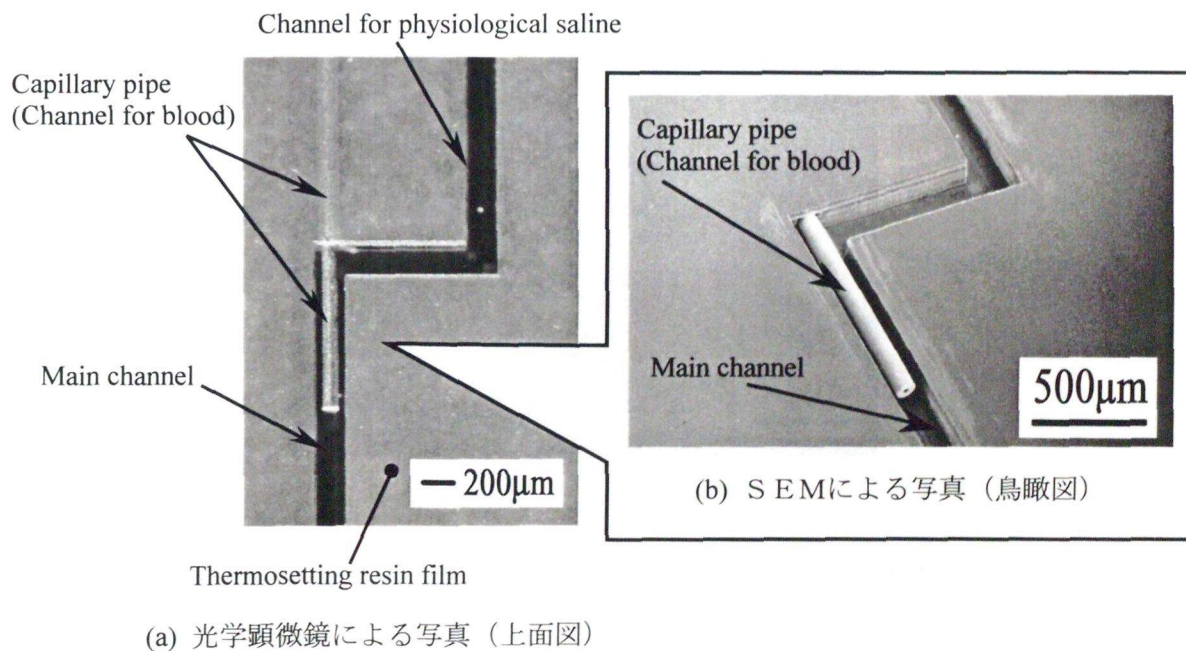


図 3-72 小径パイプを挿入した重力駆動用マイクロ流路

付けられる支流路の寸法を $100\mu\text{m}\times 100\mu\text{m}$ とし、生理食塩水用の支流路の寸法を $200\mu\text{m}\times 180\mu\text{m}$ とした。また、小径パイプには外径 $100\mu\text{m}$ 、内径 $30\mu\text{m}$ 、長さ 5mm の銅製パイプを用いた。血液用の支流路の長さ、生理食塩水用の支流路の長さは共に 20mm で、合流した主流路の長さは 10mm である。図 3-72 は 6 層目のフィルムをラミネート接着する前の 5 層目までで作製した小径パイプ流路の観察写真である。目標を満足する良好な加工形状と加工面粗さの流路が得られた。

B. 血液を用いた重力駆動実験の結果および考察

実験では、抗凝固薬を混ぜ、生理食塩水で希釈した自己血を用いた。小径パイプの支流路とその入口に接着された液溜め用リザーバに、生理食塩水で 20 倍に希釈した血液を充填した。生理食塩水用の支流路とその入口に接着された液溜め用リザーバに生理食塩水を充填した。液溜め部は大気開放されている。次に、液溜め用リザーバを上方にしてチップを垂直な状態にした。小径パイプ内の流れが主流路へ合流する位置を観察した実験結果を図 3-73 に示す。液体に加わる重力によって、生理食塩水がマイクロ流路内を流れ、さらに血液が小径パイプ内を通過して流れることが確認できた。さらに、図 3-73 に示すように血液と生理食塩水の合流位置において、血球の流れが生理食塩水によって全周から絞られ、血球が一行に並ぶ状態が確認できた。

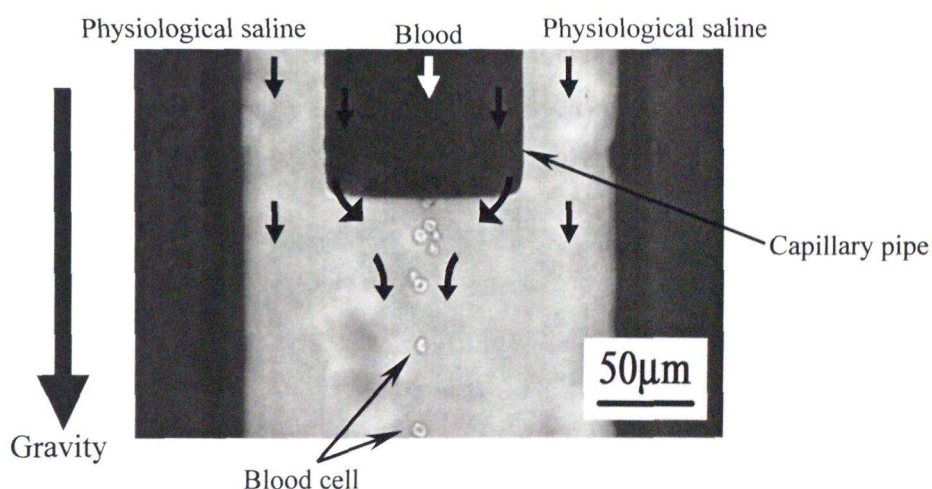


図 3-73 重力駆動による小径パイプ流路の合流位置における血球の流れ

3.6.5 複合流路における重力駆動と血球変形能観察

A. 三又構造流路と擬似毛細血管流路との複合流路の作製

マイクロ流路内の液体に加わる重力を利用して血液を送液させ、図 3-74 に示す模式図のように擬似毛細血管流路を流れる赤血球の変形状態を観察することを試みた。また、毛細管流路は血球が変形しながら流れるような流路の直径であるため閉塞してしまう可能性もあるため、血球が擬似毛細血管流路に多方向から流入することを防止することを目的として、前述の三又構造流路と擬似毛細血管流路を複合したマイクロ流路を提案し、重力駆動による赤血球変形能観察の実験を行った。はじめに、フッ素樹脂フィルムへ微小穴の加工を行い、この微小穴を擬似毛細血管のマイクロ流路に応用し、さらに、図 3-75 に示すような三又構造マイクロ流路と擬似毛細血管流路を複合した重力駆動マイクロ流路を作製した。擬似毛細管流路を形成する層には撥水性や耐薬品性に優れたフッ素樹脂を用い、矩形断面流路を形成する層にはレーザ加工性が良い熱硬化性ラミネートフィルムを用いた。図 3-76 に赤血球変形能用マイクロ流体デバイスの概略図を示す。はじめにカバーガラスにポリイミドの熱硬化性ラミネートフィルムをラミネート接着し、レーザ加工により樹脂部分に矩形断面流路となる微細溝を形成する。次に、あらかじめレーザにより擬似毛細血管流路などの微細加工を行ったフッ素樹脂フィルムをラミネート接着する。次に、レーザ加工により矩形断面の三又流路や穴などを加工した熱硬化性ラミネートフィルムをラミネート接着する。さらに、出口や入口の穴を加工した熱硬化性ラミネートフィルムをラミネート接着により積層化させ、立体流路を形成する。最後に、液溜め用のリザーバ部品を接着する。フッ素樹脂は 2.4 節で述べたダイキン工業(株)製ネオフロン EFEP を使用した。また、周辺流路は 2.3 節で述べた熱硬化性ラミネートフィルムを使用した。フッ素樹脂フィルムへのレーザ加工条件を表 3-10 に示し、熱硬化性ラミネートフィルムへのレーザ加工条件を表 3-11 に示す。

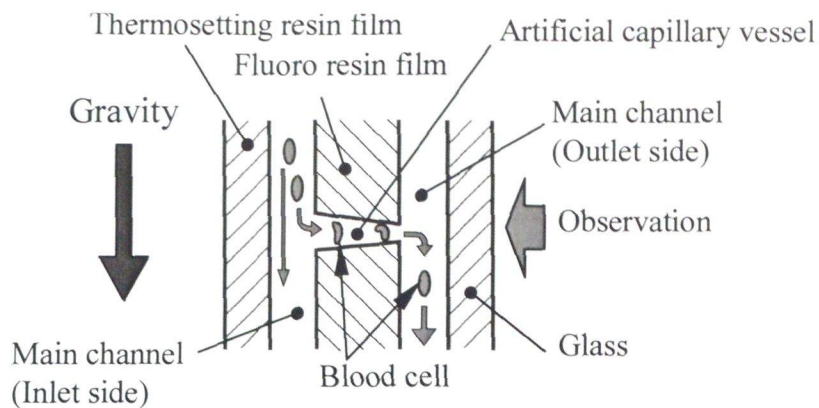


図 3-74 重力駆動によって擬似毛細血管流路を变形しながら通過する赤血球の模式図

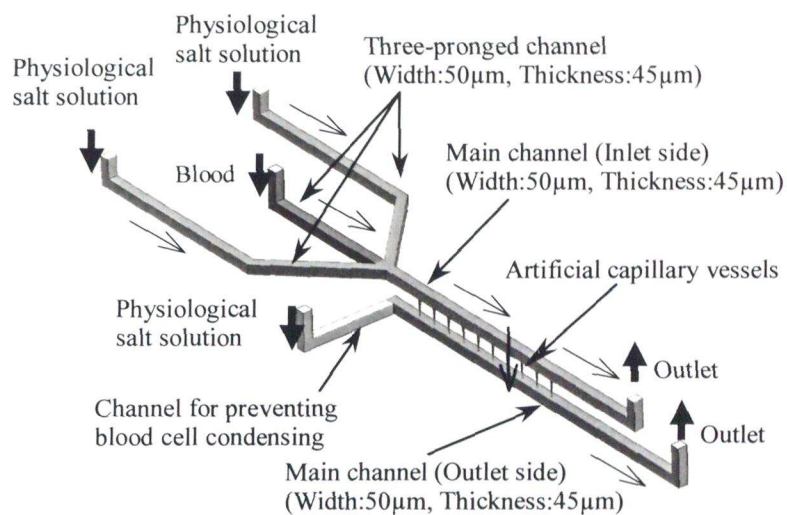


図 3-75 重力駆動を利用した赤血球変形能観察用複合立体流路の概略図

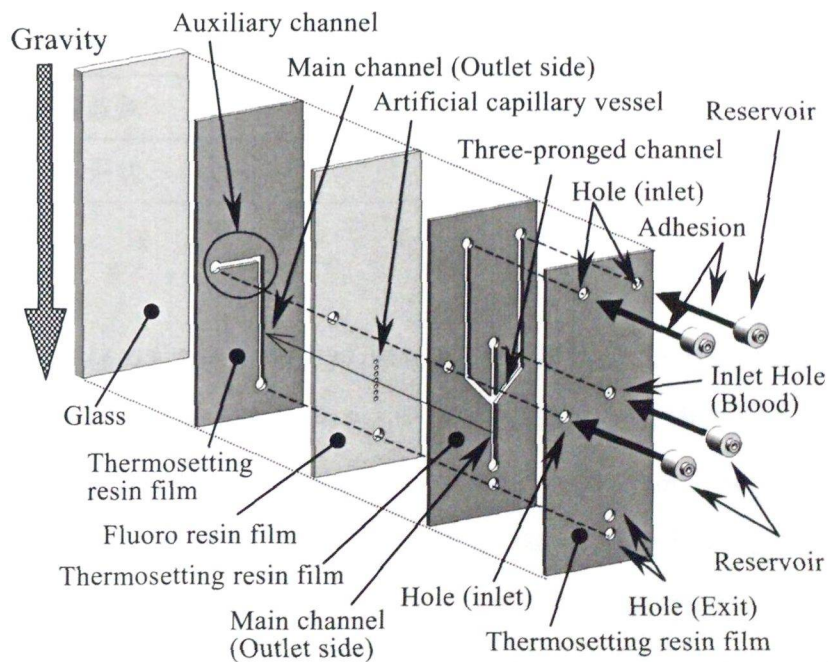


図 3-76 重力駆動を利用した赤血球変形能観察用マイクロ流体デバイスの概略図(展開図)

表 3-10 フッ素樹脂フィルムの加工条件

| | |
|----------|---|
| 加工装置 | Exitech 社製エキシマレーザー加工機 PS2000 LAMBDA PHYSIK 社製発振機 LPX200i |
| レーザー波長 | 193 nm |
| 縮小光学系倍率 | 30 倍レンズ系 |
| 発振エネルギー | 150 mJ |
| フルエンス | 7.5 J/cm ² |
| レーザー照射回数 | 825 pulse |
| 発振周波数 | 100 Hz |
| ビーム形状 | φ 17 μm |

表 3-11 熱硬化性ラミネートフィルムの加工条件

| | |
|---------|---|
| 加工装置 | Exitech 社製エキシマレーザー加工機 PS2000 LAMBDA PHYSIK 社製発振機 LPX200i |
| レーザー波長 | 248 nm |
| 縮小光学系倍率 | 10 倍レンズ系 |
| 発振エネルギー | 150 mJ |
| フルエンス | 0.75 J/cm ² |
| 発振周波数 | 100 Hz |
| ビーム形状 | 108 μm × 108 μm |

はじめに、微小径の穴を通過する時の赤血球変形能が観察できる擬似毛細血管流路の作製を行った。赤血球の直径が 8 μm であるため、それ以下の開口径を有する微小穴を加工した。図 3-77 はフッ素樹脂 EFEP フィルムに、フルエンス 7.5 J/cm²、照射回数 825 パルス、ビーム直径 17 μm の条件で加工した貫通穴の SEM 観察写真であり、(a) はレーザー照射側、(b) はレーザー出射側から観察した結果である。レーザー出射側の開口径が 5 μm 以下の穴が加工できた。レーザー照射側の穴近傍に少し堆積物が観察されるが赤血球への影響はないと考

えられ、良好な微小穴が加工できた。また、フィルム端部の近傍に穴を加工した後に、フィルム側面を研磨加工し、穴の側方から光学顕微鏡で観察した写真を図 3-78 に示す。貫通穴はテーパ形状である。

次に、入口の直径が $20\mu\text{m}$ で、出口の直径が $5\mu\text{m}$ に加工した微小穴を一行に 20 個並べ、これらの微小穴を長さ $100\mu\text{m}$ の擬似毛細血管流路として利用し、図 3-75 および図 3-76 に示すような液体に加わる重力を利用して血液を送液させ赤血球変形能を観察することを目的とした複合立体流路を作製した。この立体流路では、生理食塩水の流れによって血液の流れ幅を絞り血球を整列させるための三又構造マイクロ流路を設けている。そして、整列して流れる血液の一部が擬似毛細血管流路を通過するように、合流部の下流に擬似毛細血管流路を配置している。擬似毛細血管流路を通過した血液と流入しなかった血液が外部へ排出されるように、三又構造流路の下流部と擬似毛細血管流路の下流部に合計 2 つの出口穴を設けている。また、擬似毛細血管流路の出口付近で血球が停滞し付着することを抑制できる補助流路を提案した。血球が擬似毛細血管流路から流出する側の上流部に補助流路を設けた。この補助流路に生理食塩水を流し、擬似毛細血管流路から流出した血液とともに出口穴から外部へ流出させる。これによって擬似毛細血管流路の出口周辺において下流に向かう流れを増加させる。図 3-79 (a) は血液が流入する側の矩形断面流路と擬似毛細血管流路の SEM 観察写真であり、図 3-79 (b) は血液が流出する側の矩形断面流路と擬似毛細血管流路の SEM 観察写真である。目標を満足する良好な加工形状と加工面粗さが得られた。また、フッ素樹脂フィルムと熱硬化性ラミネートフィルムとの接着部における剥離もない。

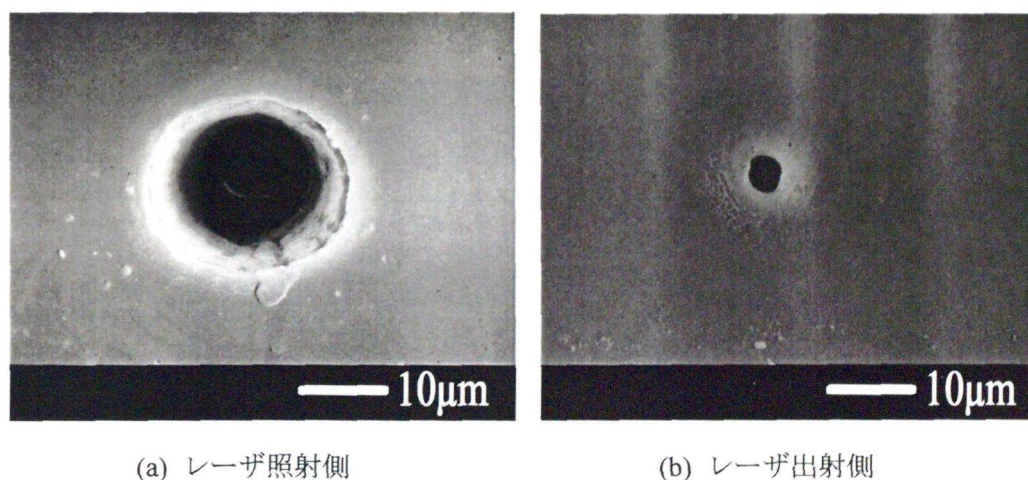


図 3-77 レーザで加工した微小穴(擬似毛細血管流路)の SEM 観察写真

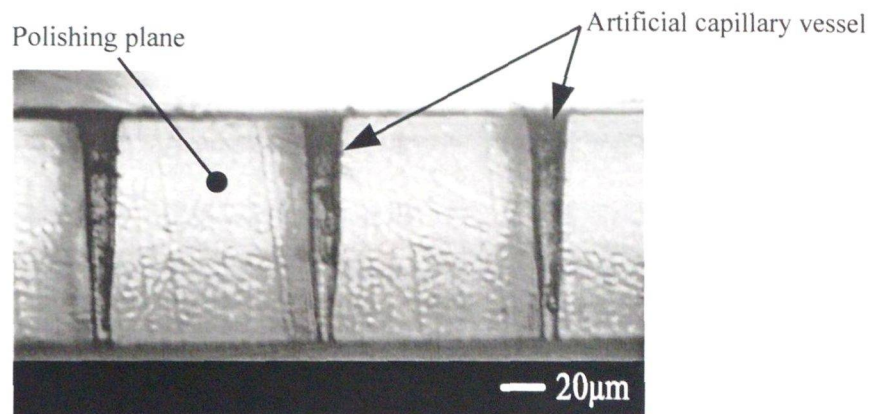
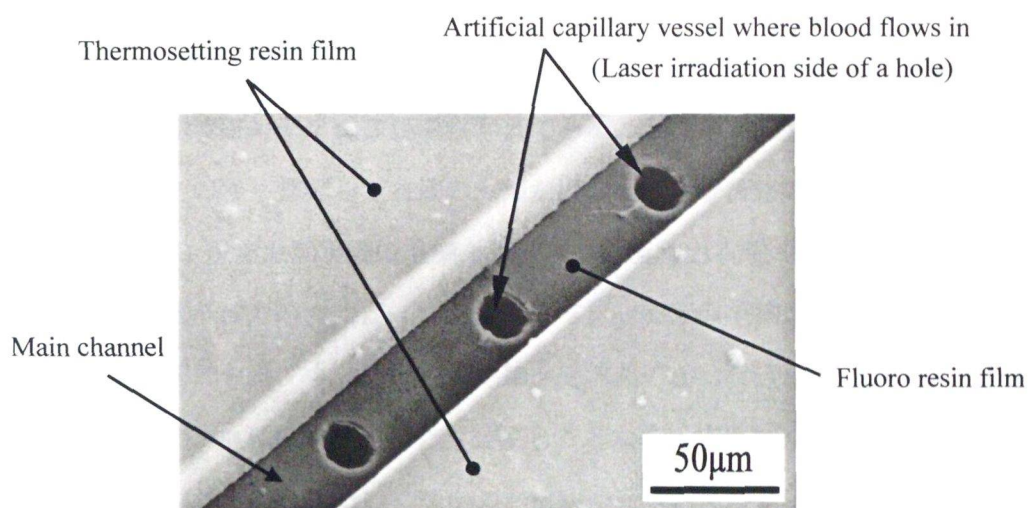
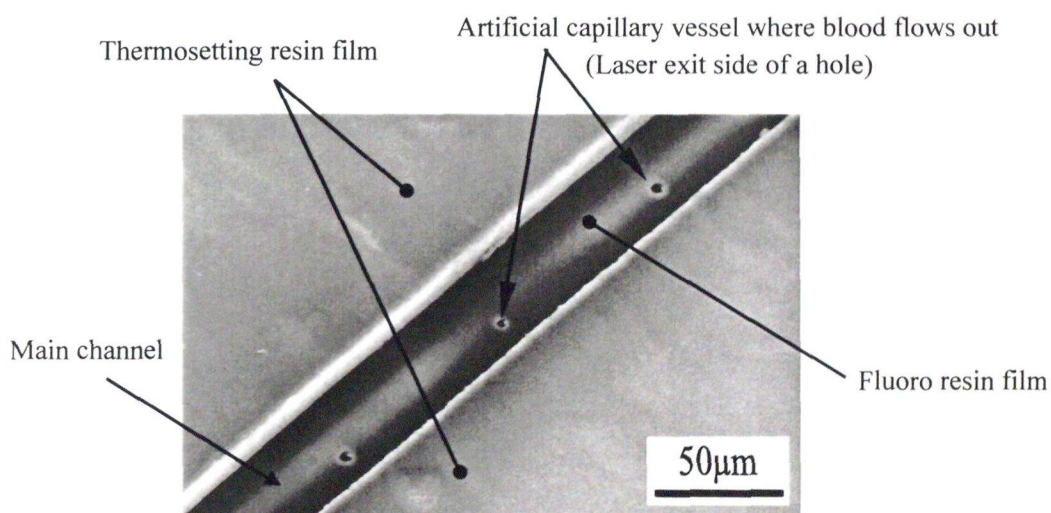


図 3-78 レーザでフィルム端部の近傍に穴を加工した後に、フィルム側面を研磨加工し、穴の側方から光学顕微鏡で観察した写真



(a) 流入側



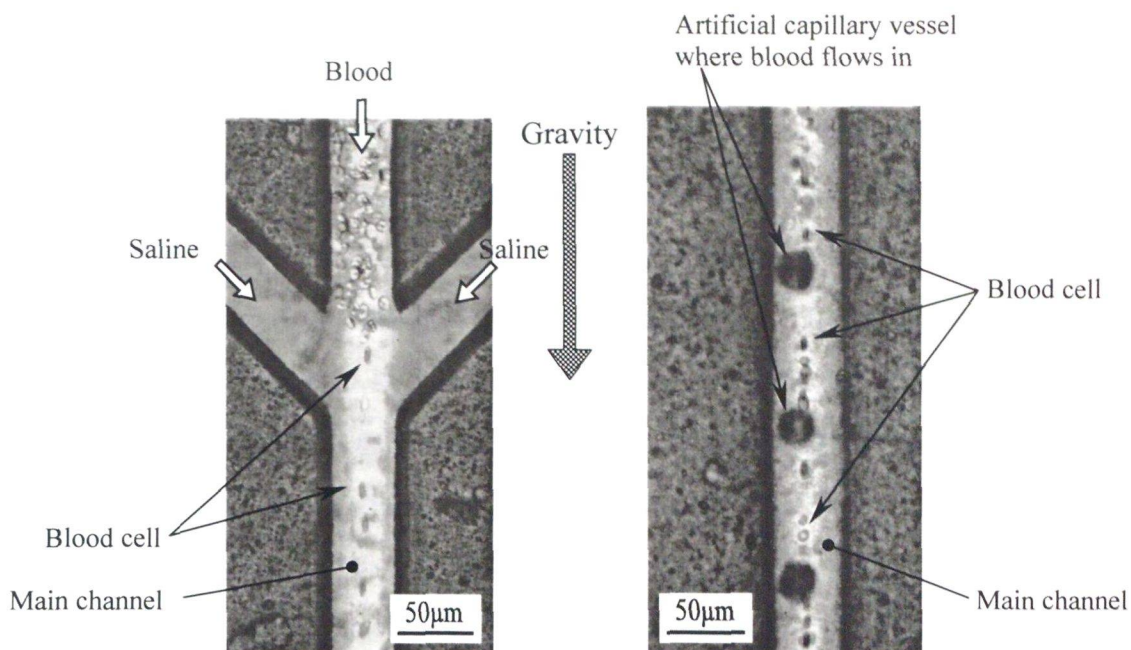
(b) 流出側

図 3-79 作製した擬似毛細血管流路と主流路のSEM観察写真

B. 複合流路の重力駆動実験の結果および考察

三又構造流路と擬似毛細血管流路を複合したマイクロ流路から構成され重力駆動を利用した赤血球変形能観察用マイクロ流体デバイスを用いて血液送液実験を行った。実験では、抗凝固薬を混ぜ、生理食塩水で希釈した自己血を用いた。三又構造流路の中央支流路とその入口に接着された液溜め用リザーバに、生理食塩水で 50 倍に希釈した血液を充填した。両サイドの支流路とその入口に接着されたリザーバに生理食塩水を充填した。さらに、補助流路とその入口に接着されたリザーバに生理食塩水を充填した。リザーバは大気開放されている。送液実験では、リザーバを上方にしてチップを垂直な状態にした。血液と生理食塩水は 2 つの出口穴から外部へ流出させた。また、光学顕微鏡に取り付けた高速度ビデオカメラによって流路内の血球の流れを観察した。

図 3-80 (a)は三又構造流路の合流位置を観察した写真で、図 3-80 (b)は血球が擬似毛細血管流路へ流入する主流路の光学顕微鏡観察写真である。三又構造流路の合流位置で血液の流れ幅が絞られ、その後、整列した血液の一部が擬似毛細血管流路の中に流れ込むことが確認できた。図 3-81 は赤血球が擬似毛細血管流路から流れ出る時の連続観察写真である。直径 $8\mu\text{m}$ の赤血球が重力の力によって出口直径 $5\mu\text{m}$ の擬似毛細血管を詰まることなく通過することが確認できた。さらに、擬似毛細血管流路の出口付近における血球の付着は発生しなかったため、血球はスムーズに（詰まることなく）流れた。また、図 3-82 は同一の擬似毛細血管流路から流れ出るいくつかの赤血球を光学顕微鏡によって観察した写真である。赤血球が擬似毛細血管流路に対して同一方向から流入し、同一方向へ流出していることが確認できた。これは血液が擬似毛細血管流路に流入する前に、血球が同一方向に整列して流れているためであると考えられる。三又構造流路と擬似毛細血管流路の複合流路にすることによって、赤血球が擬似毛細血管流路を通過する時に発生する血球の衝突や干渉を軽減することができた。



(a) 三又構造マイクロ流路の合流位置 (b) 擬似毛細血管流路の入口と主流路

図 3-80 重力駆動による血球整列と擬似毛細血管流路への赤血球の流入

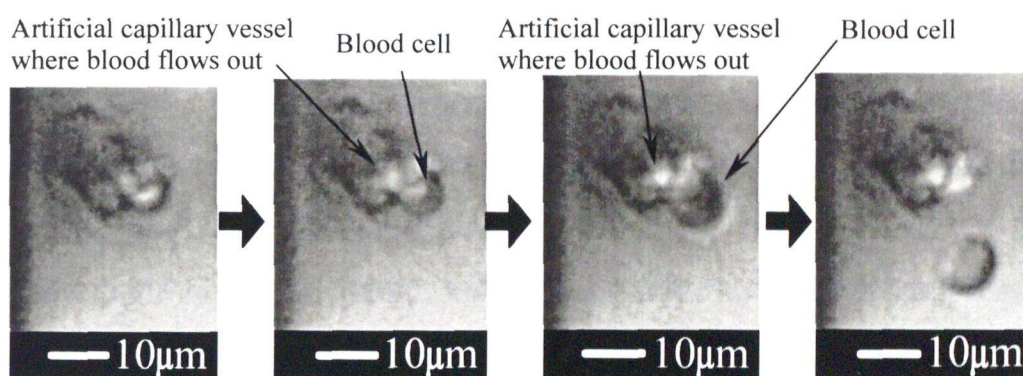


図 3-81 重力駆動によって擬似毛細血管流路から流出する赤血球の連続観察写真

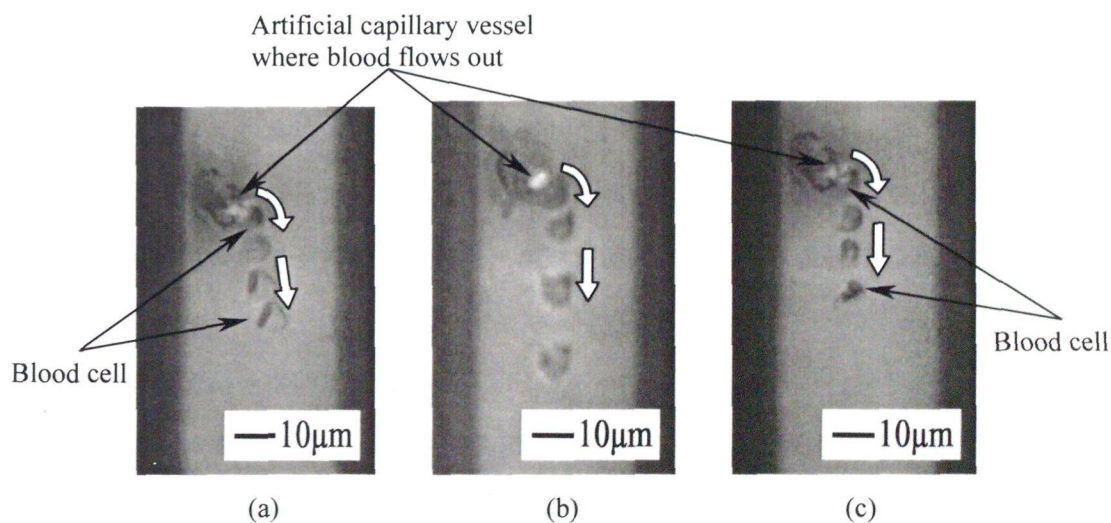


図 3-82 赤血球が同一の擬似毛細血管流路から流出する 3 パターンの観察写真

3.7 結言

本研究では血液検査のための μ TASの作製を目標としている。そこで、UVレーザ加工と樹脂ラミネート法を用いて、血液検査用 μ TASの構成要素となる数種類のマイクロ流体デバイスを作製し、それぞれに自己血を流し血球の観察を行った。具体的には、三又構造マイクロ流路や小径パイプを挿入したマイクロ流路を用いた血球整列に関する検討を行い、また、フッ素樹脂を用いた血球変形能観察用マイクロ流路における血球変形能に関する検討を行った。最後に、重力を利用した流体駆動による血球整列と血球変形能観察に関する検討を行った。それらの結果は以下のとおりである。

①三又構造マイクロ流路を用いた血球整列

- ・インクを用いて流路深さが $45\mu\text{m}$ である三又構造の流路におけるマイクロ流体の基本的な特性を調べた。流れは層流となり、三又構造流路の合流位置で混ざり合わないことが確認できた。3本の支流路のそれぞれの水圧(流量)を変化させることにより、三又流路におけるそれぞれの流れ幅を変化させることができた。
- ・血液送液実験を行った結果、サイド支流路の生理食塩水の圧力を高くすることによって三又構造マイクロ流路の合流位置で血液の流れ幅が絞られ、合流位置から数mm離れた下流位置では赤血球が一行に並んだ状態で流れることが確認できた。ただし、流路底面を転がるように流れる血球も観察された。
- ・流路の深さが $16\mu\text{m}$ である薄型三又構造マイクロ流路では、合流位置で血球凝集塊が発生した。

②小径パイプを挿入したマイクロ流路を用いた血球整列

- ・CAEを用いて流路内の流れの予測を行い、小径パイプ挿入流路の流路設計を行った。
- ・エキシマレーザ加工、微細放電加工および樹脂ラミネート法によって、小径パイプ流路を持つマイクロ流体デバイスを作製した。
- ・血液送液実験を行った結果、血液と生理食塩水の合流部分において、血球の流れが生理食塩水によって全周から絞られ、血球が流路に対して一直線上に流れていることが確認できた。

③2段階合流流路を用いた血球整列

- ・生理食塩水の流れによって血液の流れの左右方向と上下方向から血液の流れ幅を絞る立体流路すなわち2段階で合流する流路を提案し、CAEを用いて流路形状と送液条件を設計した。

- ・ 6 層の樹脂フィルムからなる 2 段階合流流路をもつマイクロ流体デバイスを作製し、血液送液実験を行った。その結果、1 段階目と 2 段階目の合流位置で血液の左右方向と上下方向の流れ幅がそれぞれ絞られ、赤血球が整列した状態で流れることが確認できた。

④フッ素樹脂を用いた血球変形能観察用マイクロ流体デバイス

- ・ 厚さ $100\mu\text{m}$ のフッ素樹脂 EFEP のフィルムに入口の直径が $20\mu\text{m}$ で、出口の直径が $5\mu\text{m}$ の微小穴をレーザで加工した。赤血球の直径の $1/10$ に近い値まで加工表面をなめらかにすることができ、目標とした擬似毛細血管の流路が得られた。
- ・ 赤血球変形能を観察することを目的とした擬似毛細血管流路をもつマイクロ流体デバイスを作製し、血液送液実験を行った。その結果、直径約 $8\mu\text{m}$ の赤血球が出口直径 $5\mu\text{m}$ の擬似毛細血管流路を詰まることなく通過することが確認できた。

⑤重力を利用した流体駆動方法

- ・ 三又構造マイクロ流路をもつマイクロ流体デバイスを使用し、小径チューブおよびリザーバをチップよりも上方に位置することによって、小径チューブやリザーバ内の液体に加わる重力によって、流路内の液体を駆動できることが、CAE および血液送液実験によって確認できた。三又構造流路の合流位置で血液の流れ幅が $13\sim 14\mu\text{m}$ に絞られ、血液の流れ中心における流速は $5\sim 6\text{mm/s}$ が得られた。
- ・ デバイスにリザーバを接着して、流路内の液体に加わる重力を利用した流体駆動方法を使用し、血液の流れ幅を絞り血球を整列させることを目的として、三又流路をもつマイクロ流体デバイスにおける流路形状の最適化を検討した。その結果、3 本の支流路および主流路の断面形状がいずれも同一で幅 $50\mu\text{m}$ 、深さ $45\mu\text{m}$ の流路形状が良好であった。リザーバの高さを検討し、血液の流れ幅を平均 $7\mu\text{m}$ に絞ることができ、血球の最大流速は約 3mm/s が得られた。
- ・ 重力駆動と血球整列を目的として、小径パイプを挿入した立体流路をもつ重力駆動用マイクロ流体デバイスを作製した。チップを垂直な状態にすることによって、流路内の液体に加わる重力を利用して血液が小径パイプ内を通過して流れることが確認でき、さらに血液と生理食塩水の合流位置において血球の流れが生理食塩水によって全周から絞られ、血球が一行に並ぶ状態が確認できた。
- ・ 三又構造流路と擬似毛細血管流路を複合したマイクロ流路から構成され、重力駆動を利用した赤血球変形能観察用マイクロ流体デバイスを作製した。チップを垂直な状態

にすることによって、直径約 $8\mu\text{m}$ の赤血球が重力の力によって出口直径 $5\mu\text{m}$ の擬似毛細血管流路を詰まることなく通過することが確認できた。さらに赤血球が擬似毛細血管流路に対して同一方向から流入し、同一方向へ流出にすることによって、赤血球が擬似毛細血管流路を通過する時に発生する血球の衝突や干渉を軽減することができた。

以上の結果から、これらのマイクロ流路は血液検査用 μTAS に適用可能であることが見出せた。血球を整列させて流すことができるマイクロ流路は、マイクロセルカウンタへの応用が期待できる。また、変形能を観察できる擬似毛細血管流路は、血液検査の1つである血球変形能測定への応用が期待できる。そして、ポンプや電気泳動力などを使用せずに、マイクロ流路内の液体を送液する方法として、重力を利用した駆動方法を考案した。この方法は、非常に微量な液体試料で送液することができ、さらにポンプユニットをマイクロ流体デバイス内に集積化することができ、血液検査用 μTAS の小型化に寄与する技術であると期待できる。

参考文献

- 1) Y. Horiike, H. Koda, S.-H.Chang, R. Ogawa, S. Hashioka, M. Nagai and H. Ogawa: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, (Tokyo, 2006), 1558 (2006)
- 2) S. S. Shevkoplyas, T. Yoshida, L. L. Munn and M. W. Bitensky: *Anal. Chem.*, **77**, 933 (2005)
- 3) A. K. Price, D. J. Fischer, R. S. Martin and D. M. Spence: *Anal. Chem.*, **76**, 4849 (2004).
- 4) E. Maeda, M. Kataoka, Y. Shinohara, N. Kaji, M. Tokeshi and Y. Baba: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, (Tokyo, 2006), 813 (2006)
- 5) 片岡正俊: 産総研 TODAY 2008.04, **8** (4), 24 (2008)
- 6) C. Blattert, R. Jurischka, I. Tahhan, A. Schoth and H. Reinecke: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, (Tokyo, 2006), 359 (2006)
- 7) M. Yamada, M. Matsuda and M. Seki: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, (Tokyo, 2006), 1052 (2006)
- 8) Y. Sun, L. C. Ng, S. K. Chua, X. M. Zhang, P. Droge, T. C. Ayi, P. H. Yap and A. Q. Liu: *Proc. Int. Conf. Electrical Engineering 2004*, (Sapporo, 2004), 267 (2004)
- 9) U. Larsen, B. Ekberg, M. Jensen: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2004*, (Malmo, Sweden, 2004), 1, 46 (2004)
- 10) T. Ichiki, T. Ujiie, T. Hara, Y. Horiike, and K. Yasuda: *Proc. Micro Total Analysis Systems '01*, (Monterey, 2001), 271 (2001)
- 11) D. P. Schrum, C. T. Cubertson, Jacobson and J. M. Ramsey: *Anal. Chem.*, **71**, 4173 (1999)
- 12) 田邊力也, 秦 誠一, 下河辺 明: 精密工学会誌, **74** (7), 746 (2008)
- 13) M. Rieseberg, C. Kasper and K. F. Reardon: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 350 (2001)
- 14) 吉田潤一, 北森武彦ら: マイクロリアクタテクノロジー～限らない可能性と課題～, (株エヌティーエス, 2005)

第4章 血球計数デバイスの開発

4.1 緒言

細胞，バクテリア，微粒子の同定やカウントなどの定量測定を行うフローサイトメーターと呼ばれる機器がある．フローサイトメーターは，細胞に蛍光染色を施し，カウントや細胞の性状に関する測定など様々な分析や細胞分取が可能である．しかし，図 4-1 に示すようにフローサイトメーターには様々な構成部品があり，従来のフローサイトメーターは大型で高価な機器であるため，自宅やケアハウスなどで気軽に検査ができない．そこで，POCT の実現には μ T A S を応用して細胞や血球などのカウントを行うセルカウンターの開発が望まれている．

μ T A S における計測や分析では，微量な流体であるため定量性と検出感度が十分な検出システムの開発が必要であり，同時に小型化が求められる．現在， μ T A S における計測や分析の手段として，画像観察，蛍光による光散乱法，光透過法，熱レンズ分光法などが研究されているが，いずれも流路外部やデバイス外部からの検出である¹⁻⁸⁾．それに対して流路内での計測では電気泳動法や電気抵抗法などが研究されている⁸⁻¹⁰⁾．したがって，分析チップは非常に小さいが対照的に周辺装置は非常に大型であるという課題がある．また，現在いくつかの研究グループがフローサイトメーターやセルカウンターを目的とした μ T A S を研究開発している¹¹⁻¹⁶⁾．このように，細胞や血球を並べて測定を行う μ T A S の研究開発がいくつか行われている．しかし，これらのデバイスでは1つ1つの細胞や血球について精度良く検出や分析を行う方法は十分に確立されていない．そこで本研究では，図 4-2 に示すように血球を一系列に並べて流すための小径パイプを挿入した流路の下流部に血球計数（カウント）を行うための検出用ファイバを配置し，ファイバを用いて計測用レーザーを照射および受光することによって流路内を流れる血球を検出して血球計数を行うことを目的とした検出システムを考案した．

既に3章で述べたように，エキシマレーザ加工と樹脂ラミネート法を用いて三又構造の流路や小径パイプを挿入した立体流路を作製し，赤血球を一系列に並べて流すマイクロ流体デバイスを開発した．そして，血液検査としての血球計数にこのデバイスを応用するためには，整列した血球の数をカウントする必要がある．血球を等間隔で流すことができればカウントが容易になると考えられる．しかし，高速・簡易検査(POCT など)をめざすため，全血または希釈血液を用いる．これは高粘性のマイクロ流体であるため，僅かな状態の変

化の影響を受けることにより流れが安定しないことや流路が非常に複雑になることも予想される。すなわち、等間隔な血球の流れの実現は容易ではないと推測されるので、流路内を任意間隔で流れる血球を計測する技術が必要になる。

本章では、ファイバとレーザ光を用いてマイクロ流路内を流れる血球を検出するシステムについて基礎実験を行った。はじめに、実験準備として計測用レーザが照射および入射される小径ファイバの端面でレーザが拡散や散乱することを防止するために、小径ファイバの端面の研磨加工を検討した。次に、エキシマレーザ加工と樹脂ラミネート法を用いて、第3章と同様な血球整列のための小径パイプを挿入したマイクロ流体デバイスに、検出のための小径ファイバを挿入することを検討した。また、受光したレーザ光を計測する電子回路を作製した。予備実験としてストレート流路に検出用の小径ファイバを挿入したマイクロ流体デバイスを用いて、小径ラテックスビーズの検出と血球の検出を行った。その結果をもとにレーザ受光用電子回路の改良を試み、血球検出の検証実験を行った。次に、検出のための小径ファイバと血球整列のための小径パイプを挿入したマイクロ流体デバイスを用いて、マイクロ流路内を整列して流れる赤血球の検出を検討した。最後に、血球検出の精度向上を目的として、2組の検出用小径ファイバを挿入したマイクロ流体デバイスと2種類の波長のレーザを使用して、血球計数の可能性について検討した。同時に、赤血球の流速測定についての検討も行った。

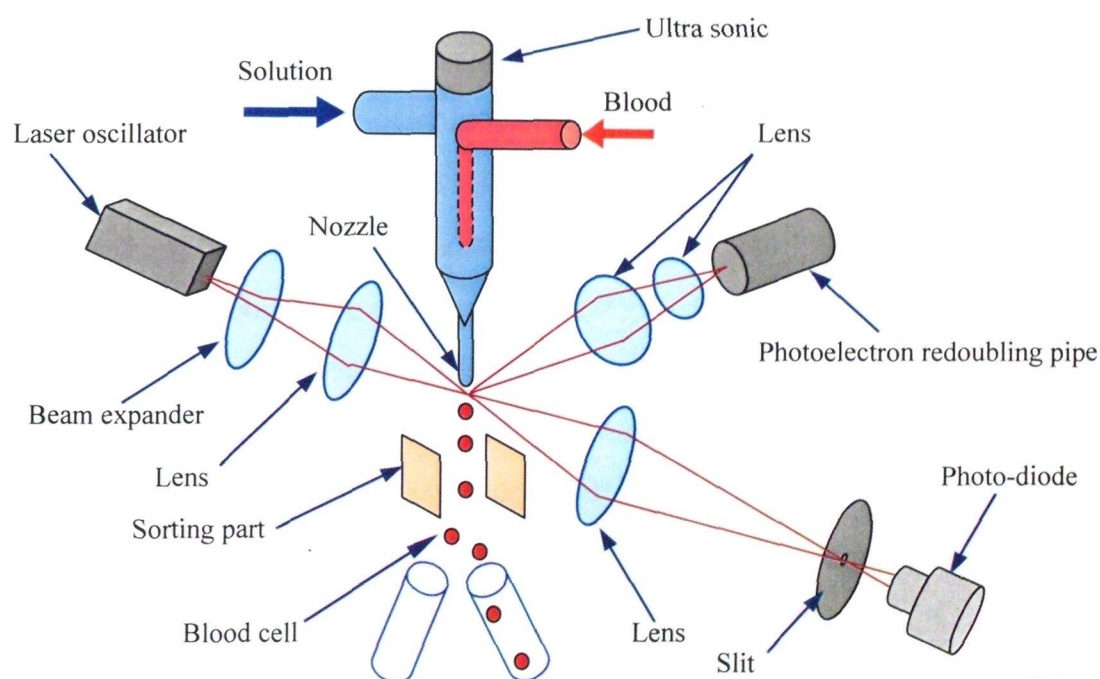


図 4-1 フローサイトメーターの原理と構成

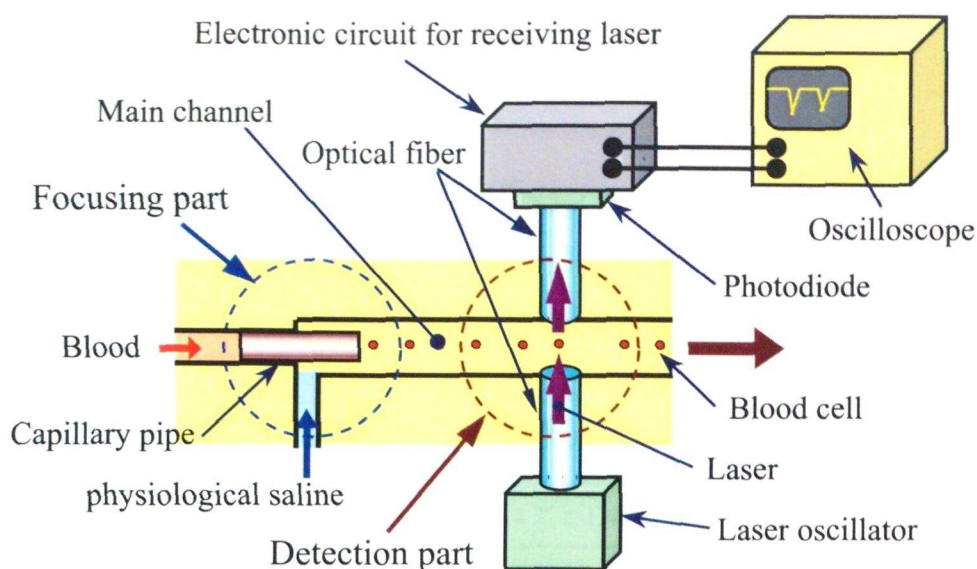


図 4-2 小径ファイバとレーザ光による検出システムとマイクロ流体デバイスの構想図

4.2 小径ファイバ端面の研磨加工技術

検出システムに用いる小径ファイバの仕様を表 4-1 に示す。はじめに、ファイバ端面でのレーザ光の散乱と拡散を防止するため、小径ファイバの端面を研磨加工した。加工実験に用いた研磨加工装置の主な仕様を表 4-2 に示し、装置の外観写真を図 4-3 と図 4-4 に示す。研磨加工用ホルダ治具へのファイバの固定は、ファイバの脱着手段や研磨荷重を加える手段を容易にすることを目的として、図 4-5 に示すように、組織観察などの用途に使用する試料埋め込み樹脂の外周面にファイバを粘着テープで固定した。研磨紙と遊離砥粒を用い、砥粒の種類、粒径、研磨時間について加工条件の検討を行った。主な加工条件を表 4-3 に示す。加工実験の結果、大きな研磨痕が発生しないように #2000 研磨紙を用いて面出しを行い、その後、粒径 $0.03\ \mu\text{m}$ のコロイダルシリカを使用して 30 分間の仕上げ加工を行った場合に加工面の状態が良好であった。図 4-6 にファイバ端面を光学顕微鏡で観察した結果を示す。また、zygo 社製の非接触表面形状測定機 NewView6300 によって加工面を測定した結果を図 4-7 と図 4-8 に示す。図 4-7 はファイバ端面の全面を測定した結果であり、図 4-8 はファイバ端面におけるコア部分のみを測定した結果である。ファイバ外周部分には加工によるダレがあるが、レーザを投光および受光する直径 $50\ \mu\text{m}$ のコア部分への影響はないと考えられる。コア部分では、表面粗さ約 $0.04\ \mu\text{mRa}$ 、約 $1.0\ \mu\text{mPV}$ 、うねり $0.05\ \mu\text{mPV}$ の加工面が得られ、鏡面となるような表面粗さ $0.1\ \mu\text{mRa}$ 以下、うねり $0.15\ \mu\text{mPV}$ 以下の目標を満足する良好な加工面が得られた。ただし、コア部分にも非常に小さな凹部が

観察でき、カケまたは砥粒の食い込みが原因であると考えられる。しかし、非常に小さな凹部であるため、血球検出に影響はないと考えられる。

表 4-1 検出用小径ファイバの主な仕様

| | |
|--------|------------------------|
| 材質 | 石英ガラス (被覆部材質：ポリイミド) |
| ファイバ種類 | ステップインデックス・マルチモード型 |
| 許容受光角 | 25.4° |
| 屈折率 | コア：1.458, クラッド：1.441 |
| 外径 | 140 μ m |
| コア径 | 50 μ m |
| クラッド径 | 125 μ m |
| 被覆厚さ | 約 7 μ m |

表 4-2 研磨加工装置の主な仕様

| | |
|--------|-------------------------------|
| 加工装置 | ムサシノ電子(株)製 精密試料研磨装置 MA-200 |
| 回転数 | 0～170 rpm 可変 |
| 回転板 | 外径 ϕ 200 mm |
| 試料保持機構 | パンタグラフ式 |



図 4-3 研磨加工装置



図 4-4 研磨加工の概要図

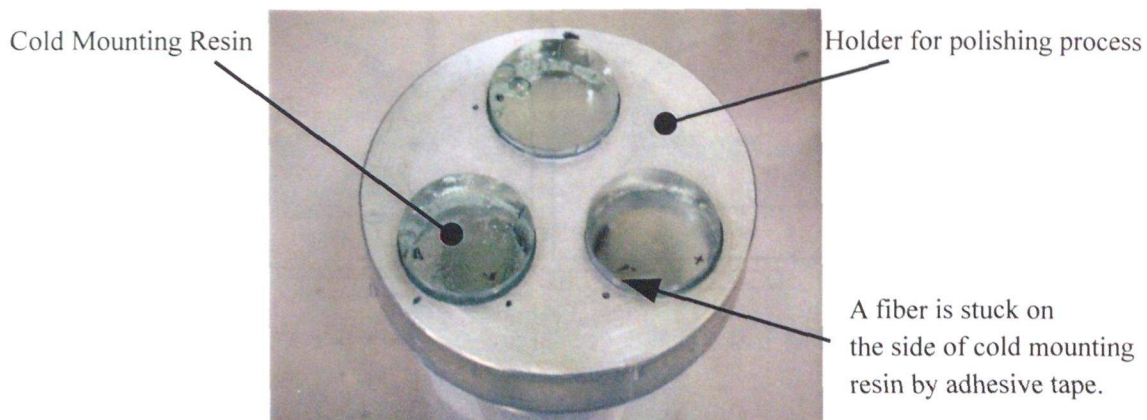


図 4-5 研磨加工用ホルダ治具とファイバの固定方法

表 4-3 小径ファイバの主な加工条件

| | | |
|--------------------|----------------------------------|---------|
| 試料固定治具 | 一般的な試料埋め込み用樹脂の外周に ファイバをテープで固定 | |
| 研磨用ウェイト | 2 5 0 g | |
| 砥粒の種類 と 研磨時間 | #1500 研磨紙 | : 30 分間 |
| | #2000 研磨紙 | : 30 分間 |
| | アルミナ粒径 0.5 μm | : 10 分間 |
| | シリカ粒径 0.03 μm | : 20 分間 |

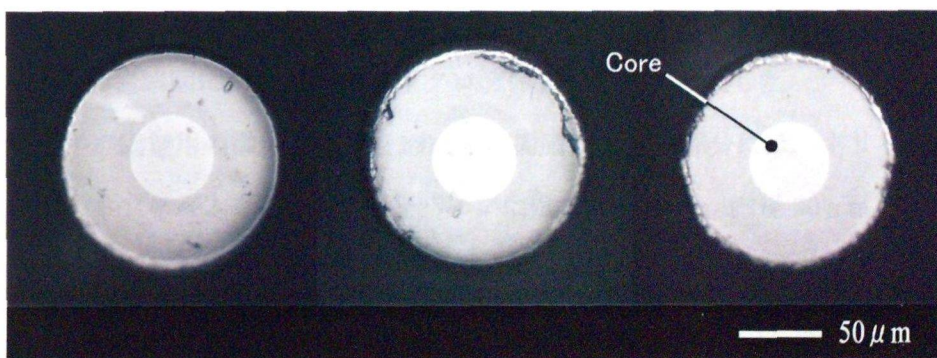


図 4-6 ファイバ端面の研磨加工面を観察した写真（代表的な 3 例）

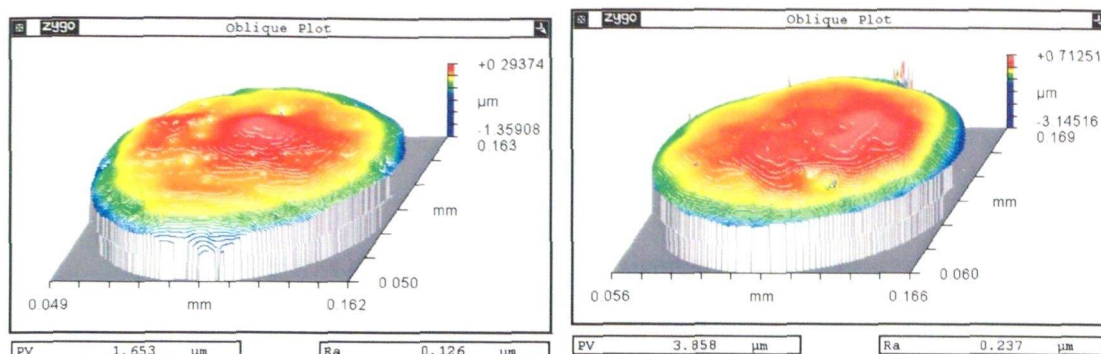


図 4-7 小径ファイバ端面の全面について表面形状を測定した結果例

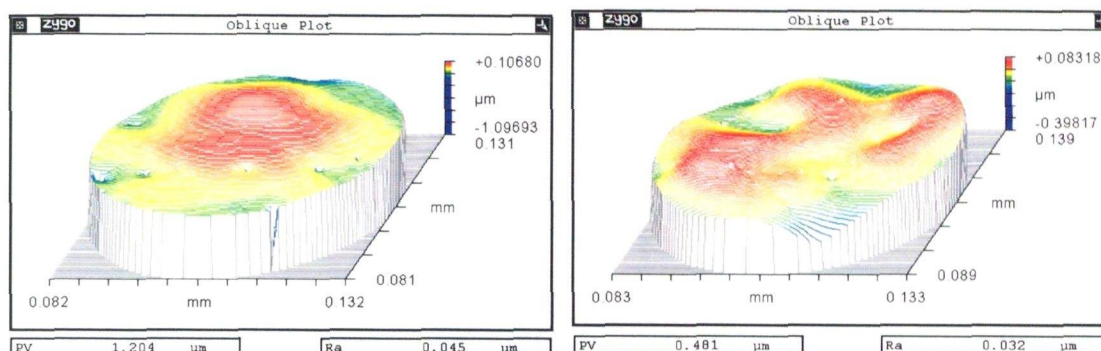


図 4-8 小径ファイバ端面のコア部分の表面形状を測定した結果例

4.3 小径ファイバを挿入したマイクロ流体デバイスの作製

3.3 節で小径パイプを挿入した立体流路を作製し、血球を一直線上に並べて流すマイクロ流体デバイスを検討した。次に、この流路の下流部に血球計数（カウント）を行うための検出用光ファイバを2本対向するように配置し、このファイバに計測用レーザを照射および受光させることを目的として、小径ファイバを挿入したマイクロ流体デバイスの作製を試みた。図 4-9 の概略図に示すようなマイクロ流体デバイスを作製した。

流路やファイバ固定用の微細溝などを形成する樹脂フィルム部分には、ポリイミドの熱硬化性ラミネートフィルムを用いた。小径パイプには外径 $100\mu\text{m}$ 、内径 $30\mu\text{m}$ 、長さ 5mm の銅製パイプを用いた。基板には $24\text{mm} \times 60\text{mm} \times 0.23\text{mm}$ のカバーガラスを用いた。また、計測のための小径ファイバには、表 4-1 に示した石英バルクファイバを用いた。マイクロ流体デバイスの作製プロセスは、はじめにカバーガラスに熱硬化性樹脂フィルムをラミネート接着し、エキシマレーザ加工により樹脂部分に微細溝や微小穴を形成する。多層化させる場合は、さらに樹脂フィルムをラミネート接着によって積層し、同様の加工を繰り返

し、立体流路を形成する。多層化する段階で、小径ファイバや小径パイプを挿入する、最後に送液用のチューブを接着する。

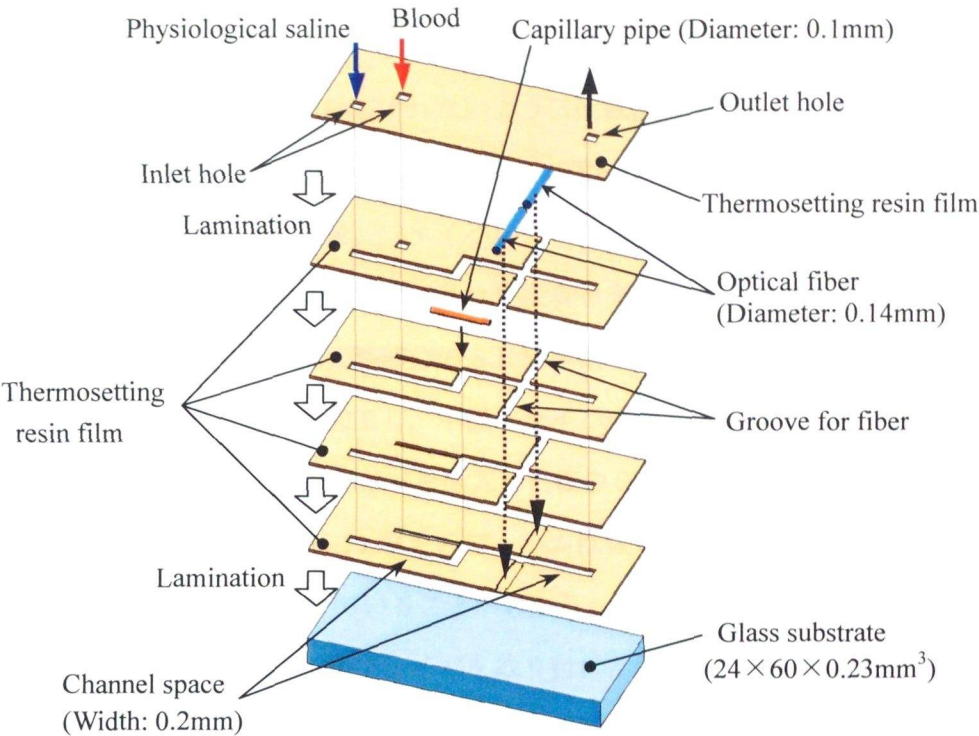


図 4-9 小径パイプと小径ファイバを挿入したマイクロ流体デバイスの概略図（展開図）

表 4-4 ファイバ取付用溝の加工条件

| | |
|---------|--|
| 加工装置 | Exitech 社製エキシマレーザ加工機 PS2000 LAMBDA PHYSIK 社製発振機 LPX200i |
| レーザ波長 | 248 nm |
| 縮小光学系倍率 | 1 0 倍レンズ系 |
| 発振エネルギー | 150 mJ |
| フルエンス | 0.75 J/cm ² |
| 発振周波数 | 100 Hz |
| ビーム形状 | 108 μ m × 108 μ m |

エキシマレーザ加工と樹脂ラミネート法を用いて、検出のための小径ファイバと血球整列のための小径パイプを挿入したマイクロ流体デバイスを作製した。エキシマレーザによるファイバ固定用微細溝の加工条件を表 4-4 に示す。また、図 4-10 のファイバ固定用溝の概略図に示すように、外径 $140\text{ }\mu\text{m}$ の小径ファイバを断面形状が $200\text{ }\mu\text{m} \times 180\text{ }\mu\text{m}$ の流路に対して直交するような溝とし、レーザの投光面と受光面の距離は $200\text{ }\mu\text{m}$ とした。さらに、対向した 2 本のファイバの光軸がずれないように位置決めすることとファイバの固定が確実に配置できるように、位置決め用ガイドリブと溝底面の中心線上に $20\text{ }\mu\text{m}$ 程度の溝形状を設けた。ファイバ取り付け後、ファイバが光軸方向に移動しないようにファイバ側面のガイドリブがない空間部分(隙間)にシリコン接着を充填し固定した。図 4-11 は小径パイプを挿入し 4 層目まで加工した流路部分の SEM 観察写真である。図 4-12 は 3 層目までの流路とファイバ固定用微細溝を加工し、小径ファイバを挿入する前の SEM 観察写真であり、図 4-13 は固定用溝に小径ファイバを挿入した後の SEM 観察写真である。固定用溝の深さが $140\text{ }\mu\text{m}$ 以上となるように 1 層目のフィルムは数 μm 加工し、溝底面の中心線上に $20\text{ }\mu\text{m}$ 程度の溝形状が加工できていることがわかる。ガイドリブは溝深さ方向に対してテーパ形状になっているため、小径ファイバを取り付けた時に、ファイバが求心する位置決め構造となっている。マイクロ流路およびファイバ固定用溝は目標を満足する良好な形状に加工することができ、デバイスに対する小径ファイバの固定や流路に対するファイバの位置決めも確実にできた。

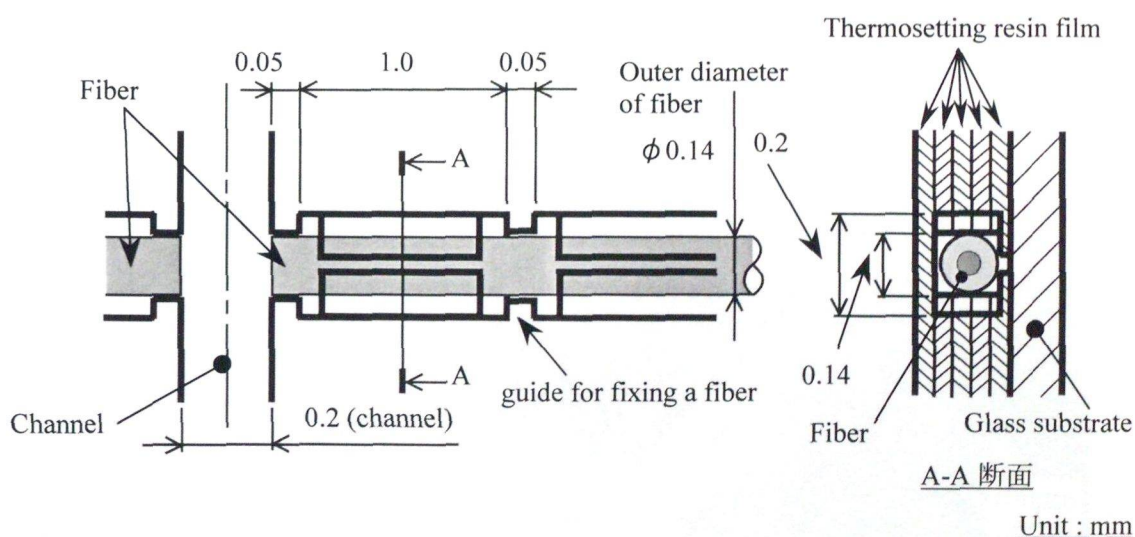


図 4-10 ファイバ取付用溝の概略図

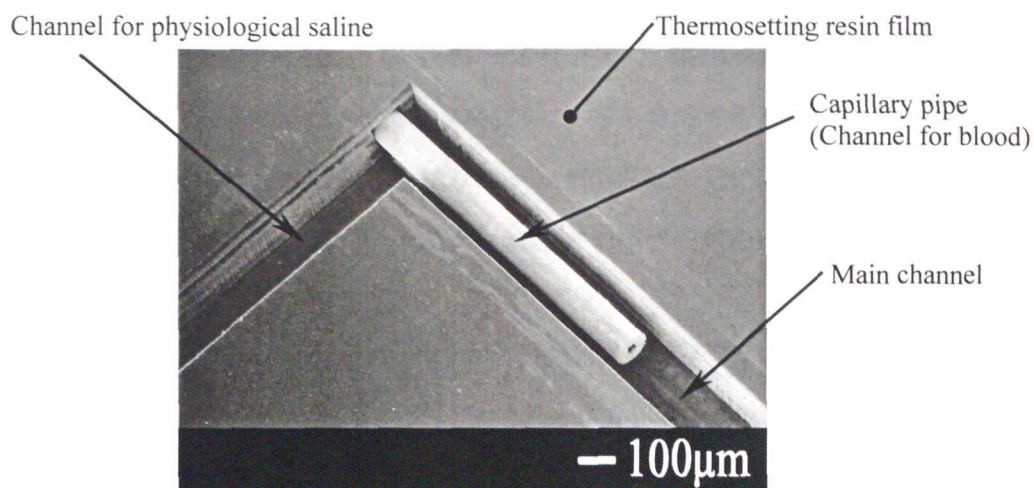


図 4-11 4層目までの小径パイプを挿入した微細溝のSEM写真

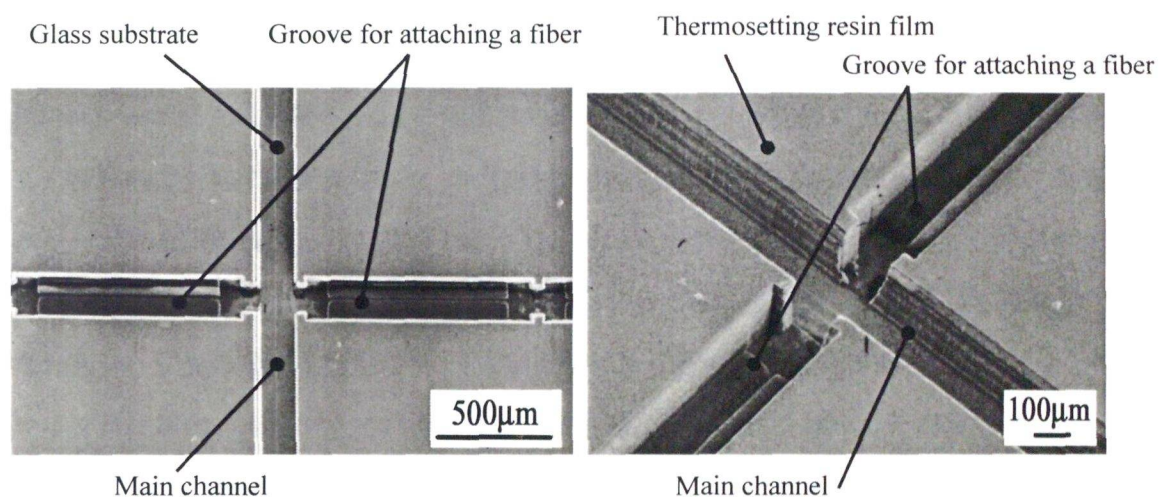


図 4-12 3層目まで加工した小径ファイバ取付用微細溝のSEM写真

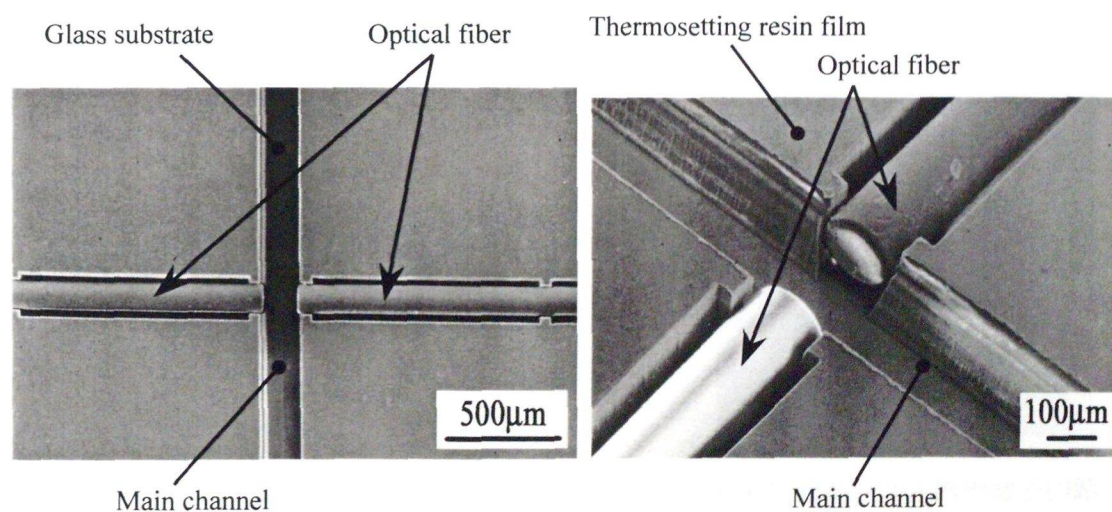


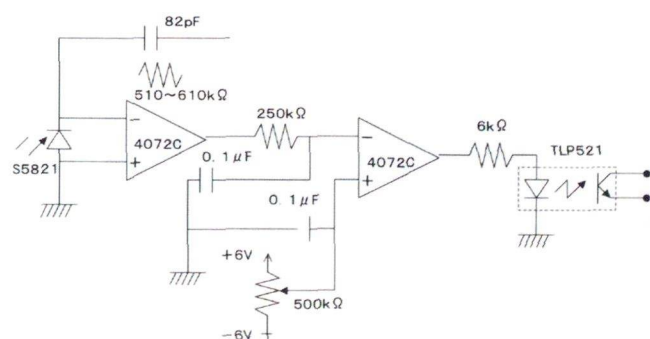
図 4-13 小径ファイバを挿入した3層目までの微細溝のSEM写真

4.4 受光用電子回路の作製とレーザによる予備実験

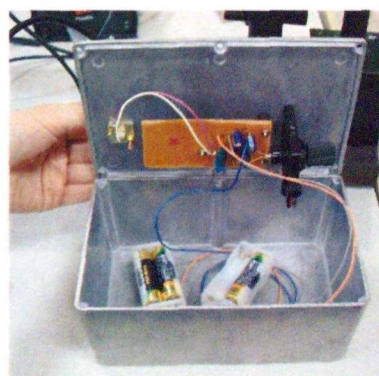
4.4.1 受光用電子回路の作製と小径ビーズを用いた検出実験

4.2 節で小径ファイバの端面の研磨加工を検討し、目標を満足する良好な加工面が得られた。ただし、コア部分の小さな凹凸やうねりがレーザの投光や受光に僅かに影響することとも予想されるため、予備実験として、マイクロ流路に小径ビーズを送液し、小径ファイバとレーザ光を用いてビーズを検出した。

はじめに、図 4-14(a)に示す回路図のようにフォトダイオードで受光したレーザ光を計測する回路を設計し、図 4-14(b)に示すようなレーザ受光用電子回路を作製した。次に、小径ビーズを純水に拡散させマイクロ流路に送液し、小径ファイバとレーザ光を用いてビーズの検出を行った。図 4-15 に実験で使用した装置の概略図を示す。送液にはシリンジポンプを用いた。小径ビーズには、赤血球の直径が約 $8\mu\text{m}$ であるため、図 4-16 に示すような平均外径（平均粒径） $10\mu\text{m}$ のラテックスビーズを用いた。検出用レーザには波長 633nm の He-Ne レーザまたは波長 532nm の半導体レーザを用いた。投光側ファイバにレーザを照射し、流路内で対向する受光側ファイバに受光用電子回路を接続することによって、受光したレーザ光を電圧波形として測定した。そして、レーザ受光用電子回路をオシロスコープに接続し、計測した DC 信号の変化部分を抽出するために AC 信号に変換して波形変化すなわちレーザ光の変化を測定した。光学顕微鏡に取り付けた高速度ビデオカメラによって、マイクロ流路内の小径ファイバ挿入位置を流れる小径ビーズを観察した写真を図 4-17 に示す。さらに、レーザの光路上に小径ビーズが進入し、小径ビーズがレーザ光を遮光しながら通過した時の受光結果を図 4-18 に示す。実験の結果、小径ビーズの通過による電圧波形の変化を確認することができた。このことから、研磨加工したファイバ端面の表面粗さが小径ビーズを検出する上で問題ないことが確認できた。



(a) 回路図



(b) 受光ボックス内の電子回路

図 4-14 受光用ファイバのレーザ光を計測するためのレーザ受光用電子回路

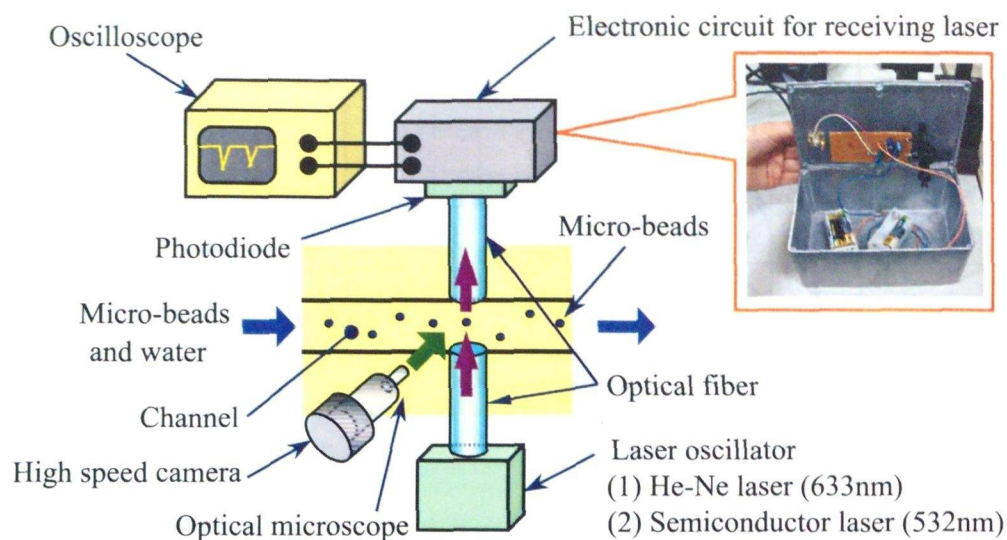


図 4-15 検出予備実験に使用した実験装置の概略図

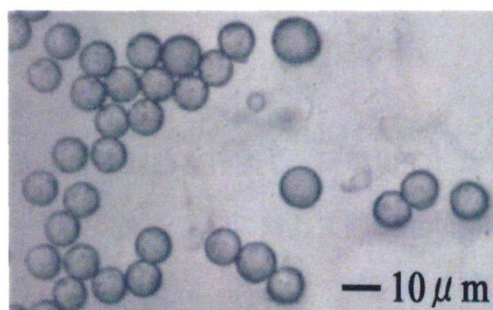
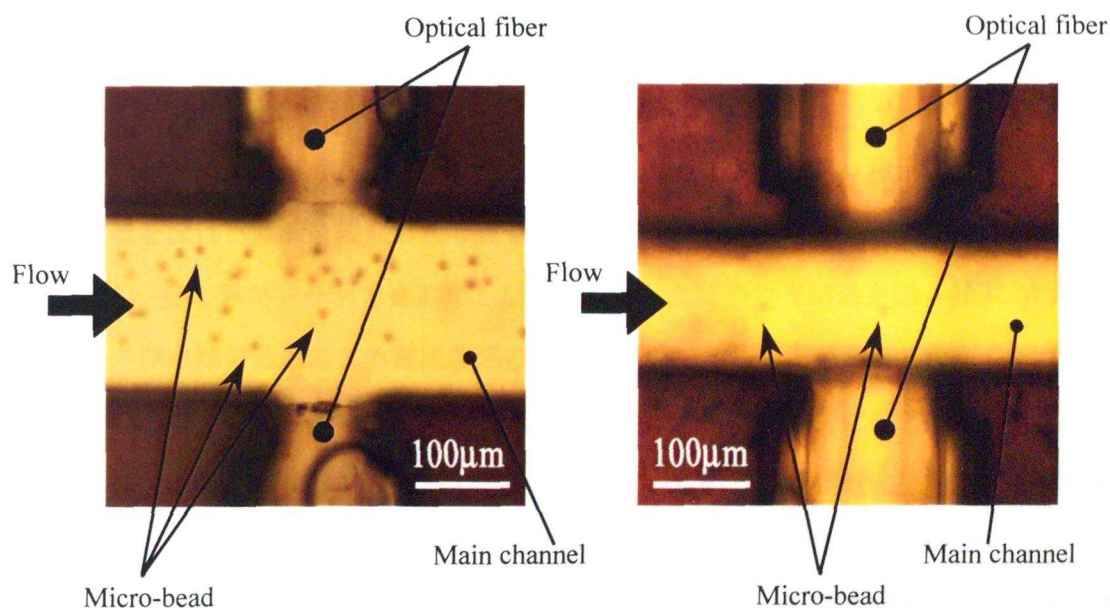


図 4-16 検出予備実験に使用したラテックスビーズ



(a) 小径ビーズ量：多

(b) 小径ビーズ量：少

図 4-17 マイクロ流路のファイバ位置を流れる小径ビーズ

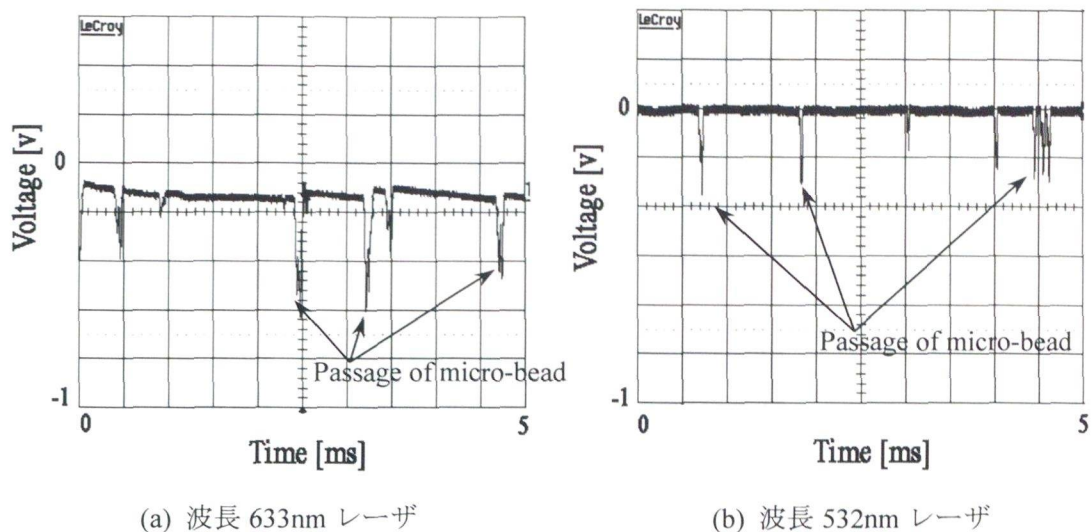


図 4-18 レーザを受光した電圧波形における小径ビーズ通過による波形変化

4.4.2 血液を用いた検出実験

4.4.1 節では、レーザ受光用電子回路を作製し、研磨加工したファイバ端面のコア部分の小さな凹凸やうねりがレーザの投光や受光に対して問題がなく、小径ビーズの通過による電圧波形の変化を確認することができた。次に、マイクロ流路に血液を送液し、小径ファイバとレーザ光を用いて血球を検出した。

実験で使用した装置は前節の図 4-15 に示す概略図と同様である。自己血を生理食塩水で希釈しマイクロ流路に送液し、赤血球を検出する予備実験を行った。検出用レーザには波長 633nm の He-Ne レーザまたは赤血球の吸光度が高い波長 532nm の半導体レーザを用いた。光学顕微鏡に取り付けた高速度ビデオカメラによって、マイクロ流路内の小径ファイバ挿入位置を流れる血液を観察した写真を図 4-19 に示す。さらに、レーザの光路上に赤血球が進入し、赤血球がレーザ光を遮光しながら通過した時の受光結果を図 4-20 に示す。実験の結果、赤血球の通過による電圧波形の変化が僅かであることがわかった。レーザ強度が小さいことなどから検出感度が十分には確保できないことと小型化などの影響によって電圧波形にノイズが含まれていることがわかる。このため、電圧波形変化から赤血球の通過を判断することは難しい。電圧波形変化が僅かである原因として、赤血球におけるレーザ光の吸収が小さいこと、純水中のラテックスビーズに比べて生理食塩水中の赤血球は屈折率比が小さいこと、球形状の小径ビーズに比べて赤血球は円盤のような形状であるためレーザ光の散乱が小さいことなどが考えられる。

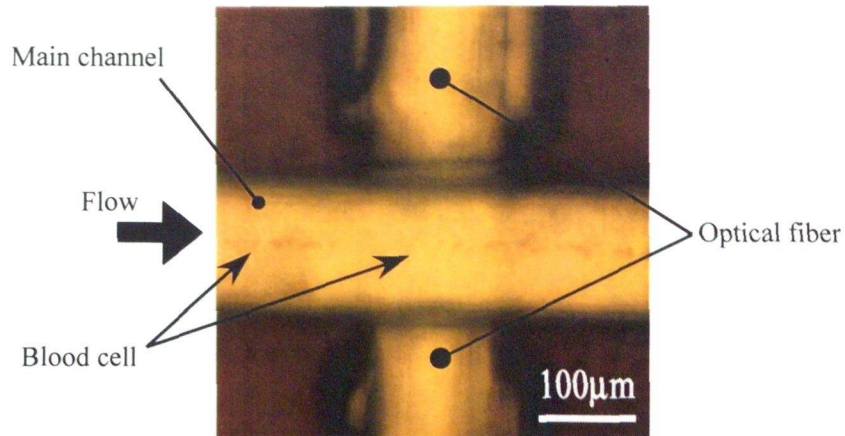


図 4-19 マイクロ流路のファイバ位置を流れる血球

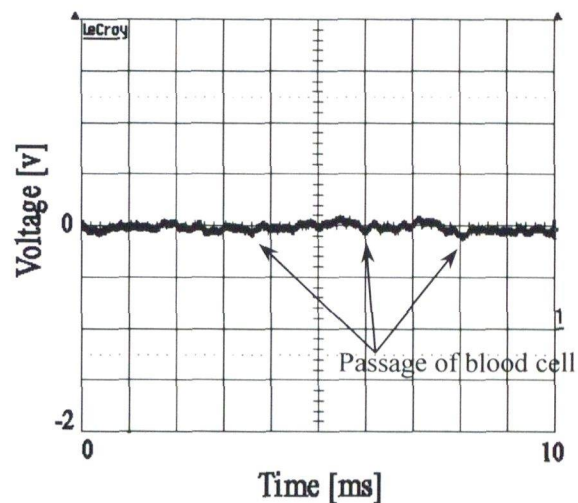


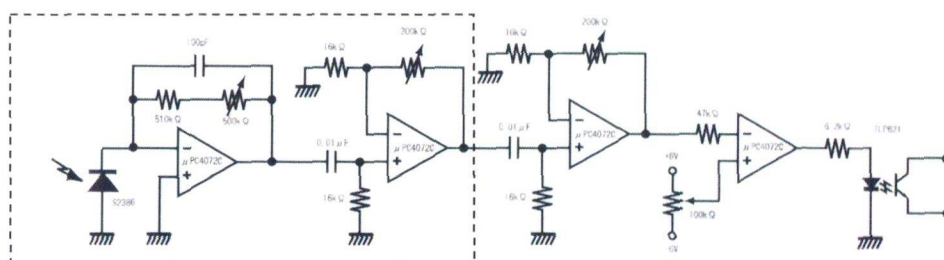
図 4-20 波長 532nm レーザを受光した電圧波形における血球通過による波形変化

4. 4. 3 高感度受光用電子回路による血球検出実験

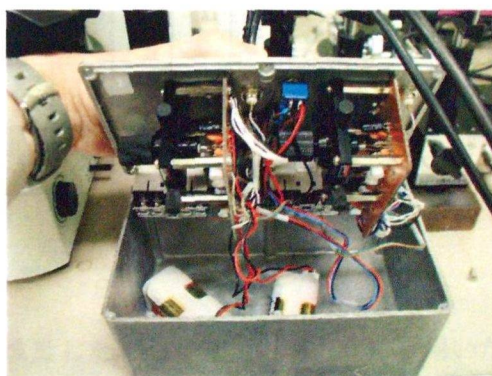
検出システムを用いた予備実験において、小径ビーズの通過では大きな電圧波形の変化が検出されたが、赤血球の通過では電圧波形の変化が僅かであった。そこで、レーザ受光用電子回路を改良することによって、赤血球の通過による電圧波形変化を拡大することを試みた。検出精度の確認を行うために、赤血球の透過光を測定する予備実験を行った。

レーザ受光用電子回路は次の 2 つの機能を追加し改良した。1 つ目は、受光した信号の変化量を拡大するために、アナログ信号の増幅率を改良前の 10 倍程度に増加させた。2 つ目は、赤血球の通過による信号変化とノイズとを分離させるために、赤血球の通過が確

認できるようなサンプリング周波数を考慮し、その信号周波数（1kHz～10kHz）のみを取り出すフィルタを設けた。図 4-21(a)に示すような回路を設計し、図 4-21(b)に示すような改良したレーザ受光用電子回路を作製した。このレーザ受光用電子回路を検証するために簡易的な予備実験を行った。図 4-22 に実験で使用した装置の概略図を示す。スライドガラス上に赤血球を重複が起こらないように生理食塩水とともに付着させ、その後スライドガラスを面方向に移動させることによって、レーザの光路上を赤血球が通過する時のレーザ光の変化を測定する予備実験を行った。投光側ファイバにレーザを照射し、受光側ファイバに受光用電子回路を接続することによって、受光したレーザ光を電圧波形として測定した。そして、レーザ受光用電子回路をオシロスコープに接続し、計測した DC 信号の変化部分を抽出するために AC 信号に変換して波形変化すなわちレーザ光の変化を測定した。検出用レーザには波長 633nm の He-Ne レーザよりも赤血球の吸光度が高い波長 532nm の半導体レーザを用いた。流路内を流れる場合と同程度の速度でスライドガラスを移動させ、ガラス上の赤血球がレーザ光を遮光しながら通過した時の受光結果を図 4-23 に示す。小径ビーズの場合と類似した電圧の波形変化を示した。これらの結果、レーザ受光用電子回路を改良することによって赤血球が通過した時の波形変化を確認することができた。



(a) 回路図



(b) 受光ボックス内の電子回路

図 4-21 受光用ファイバのレーザ光を計測するための改良後のレーザ受光用電子回路

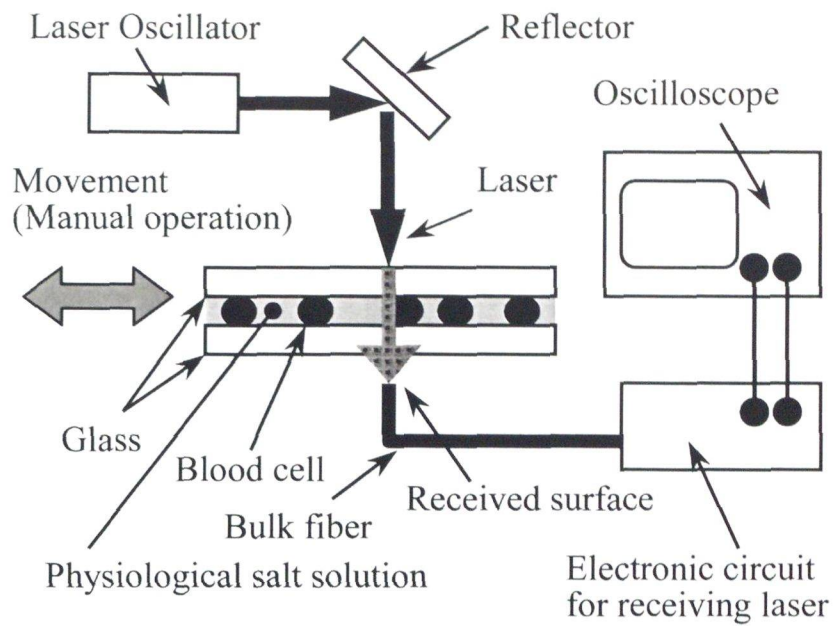


図 4-22 検出予備実験に使用した実験装置の概略図

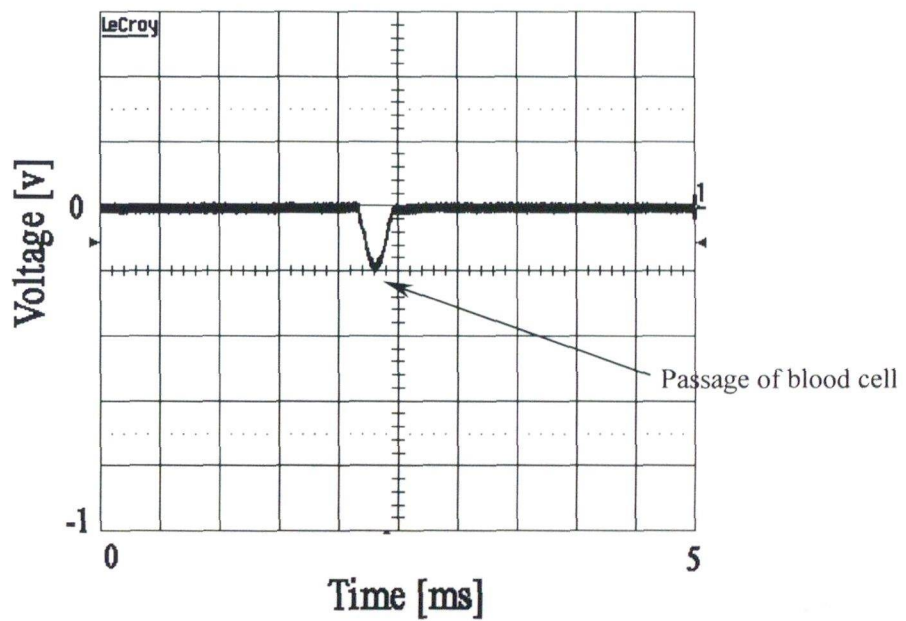


図 4-23 改良したレーザ受光用電子回路を用いた血球検出

4.5 マイクロ流体デバイスを用いた検出実験

4.5.1 シングルファイバによる血球検出

前節では、検出の予備実験を行うことによって、端面を研磨加工した小径ファイバがレーザーの投光や受光において問題がないことを検証し、また、赤血球が通過した時の波形変化を確認することができ、作製したレーザー受光用電子回路が有効であることがわかった。次に、マイクロ流路内を整列して流れる血球数を計測することを目標として、検出のための小径ファイバと血球整列のための小径パイプを挿入したマイクロ流体デバイスを用いて赤血球の検出を試み、本システムによる血球計数についての検討を行った。

図 4-24 に実験で使用した装置の概略図を示す。流体の観察には光学顕微鏡に取り付けた高速ビデオカメラを用いた。血球検出実験では、投光側ファイバにレーザーを照射し、流路内で対向する受光側ファイバにレーザー受光用電子回路を接続することによって、受光したレーザー光を電圧波形として測定した。そして、レーザー受光用電子回路をオシロスコープに接続し、計測した DC 信号の変化部分を抽出するために AC 信号に変換して波形変化すなわちレーザー光の変化を測定した。検出用レーザーには、赤血球の吸光度が高い波長 532nm または波長 405 nm の半導体レーザーを用いた。マイクロ流路には、小径パイプ流路に流入する支流路に生理食塩水で希釈した自己血を送液し、小径パイプの外周部分に流出する支流

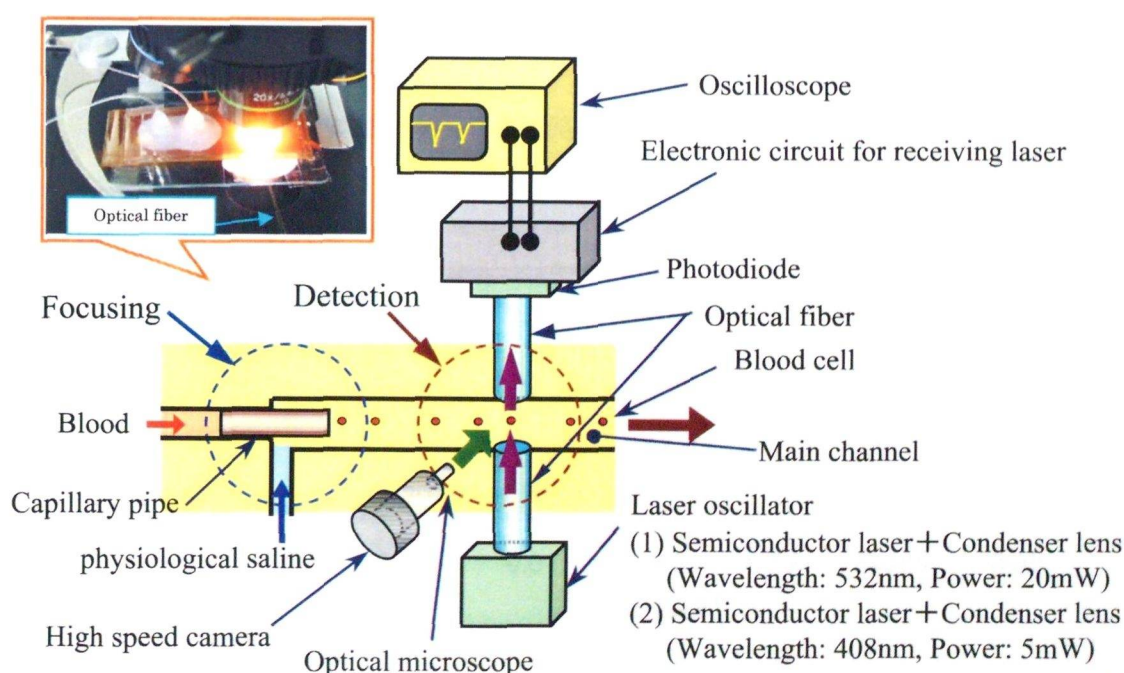


図 4-24 血球検出実験に使用した実験装置の概略図

路に生理食塩水を送液した。送液にはシリンジポンプを用いた。図 4-25(a)は小径パイプの出口部分でパイプ内から吐出する流れとパイプの外周部の流れとが合流する位置を光学顕微鏡で観察した写真である。血液と生理食塩水の合流部において血液の流れの全周を生理食塩水のシーフローで覆うことによって血球が整列していることがわかる。また、この合流位置の3mm 下流部に配置した検出用ファイバ部分を観察した写真を図 4-25(b)に示す。対向する 2 本のファイバの中央付近を血球が整列して流れていることが確認できた。次に、投光用ファイバによって流路内に波長 532 nm のレーザを照射し、受光用ファイバと受光用電子回路を用いてこの時のレーザ光を測定した。測定した電圧波形を図 4-26 に示す。赤血球が流路内のファイバ部分を通過した時の電圧波形変化を確認することができた。また、流路内を並んで流れる赤血球を観察した画像と、その時に受光したレーザ光の電圧波形と

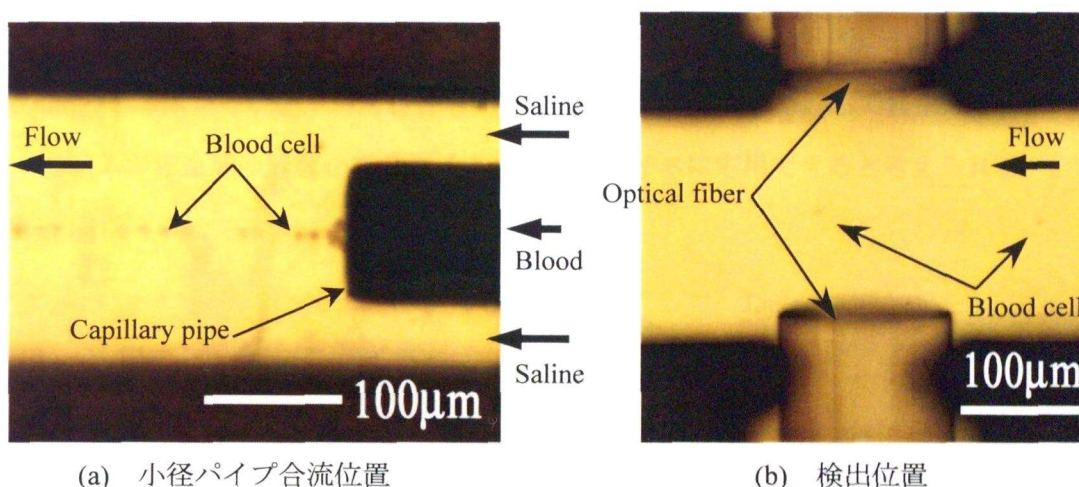


図 4-25 マイクロ流路における血液の流れ

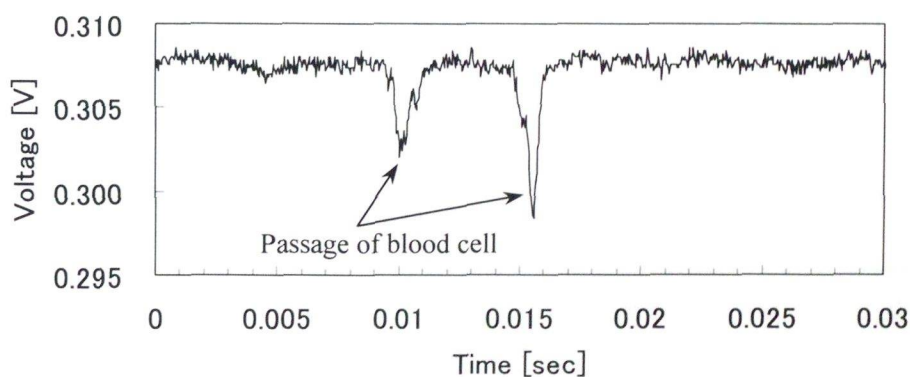


図 4-26 流路内を整列して流れる血球を検出した電圧波形

を図 4-27 に示す。下流方向に向かって並んで流れる赤血球の間隔(整列状態)と、電圧波形が変化する時間間隔とが対応していることがわかる。また、ファイバのコア径が $50\text{ }\mu\text{m}$ であるため流路内に照射されるレーザ光の直径も $50\text{ }\mu\text{m}$ 前後であるが、赤血球の直径が約 $8\text{ }\mu\text{m}$ であるため、レーザの光路上に2つ以上の赤血球が同時に存在する可能性がある。図 4-27 において、間隔が $50\text{ }\mu\text{m}$ 以下に近接して流れる2つの赤血球や重複して流れる2つの赤血球がファイバ位置を通過した場合は、電圧波形の変化量が大きくなることや、極小値が2つ現れることなどがあった。このように顕微鏡と高速ビデオカメラを用いて赤血球を観察した結果とファイバによる赤血球検出結果とが一致していることが確認できた。ただし、赤血球の通過による電圧波形変化は、同じ変化率や同じ傾向の波形ではなく、流れている赤血球毎に異なる。この原因として、流路内に照射されたレーザ光の強度分布が均一ではないことや、レーザの光路に対して赤血球が通過する位置が僅かに異なることや、赤血球が円盤形状であるためレーザの光軸に対する赤血球の姿勢などが考えられる。波長 405 nm の半導体レーザを用いた場合も同様な結果が得られた。これらの結果から、この検出システムが赤血球の計数を行うマイクロ流体デバイスに応用できると考えられる。

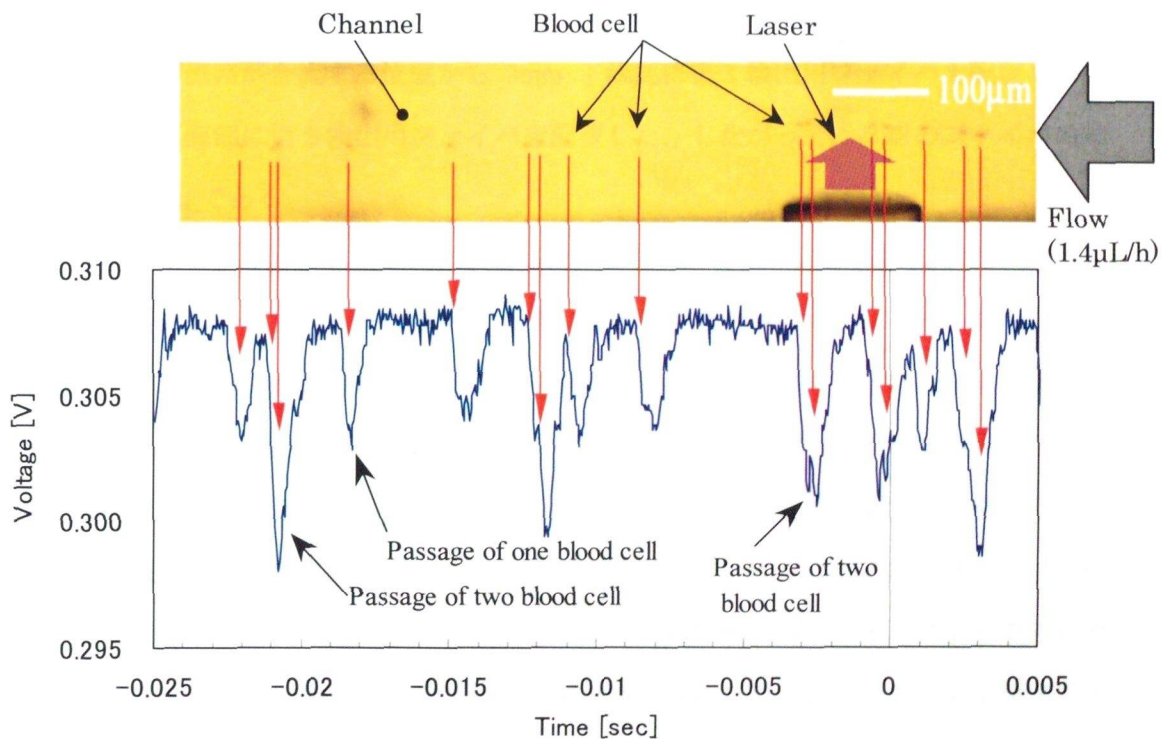


図 4-27 流路内を整列して流れる血球の観察結果とその血球を検出した電圧波形

4.5.2 ダブルファイバによる検出精度の向上と流速測定

4.5.1 節では、小径ファイバと小径パイプを挿入したマイクロ流体デバイスを用いて、血球を整列して流し、流路内のファイバ位置を赤血球が通過した時の電圧波形変化を確認できた。さらに、近接や重複して流れる 2 つの赤血球も電圧波形変化から確認することができた。しかし、どの場合にも確実な重複判別ができるとは限らず、また赤血球の通過による電圧波形変化は、同じ変化率や同じ傾向の波形ではなく、流れている赤血球毎に異なることもわかった。対策として、赤血球を等間隔で流すことや、血球の姿勢を同一方向に維持した状態で流すことが考えられるが、高粘性のマイクロ流体であるため僅かな状態の変化の影響を受けることにより流れが安定しないことや流路が非常に複雑になるため、実現性は乏しい。そこで、血球検出の精度向上を目的として、2 組の検出用小径ファイバを挿入したマイクロ流体デバイスを作製し、2 種類の波長のレーザとこのデバイスを使用して、血球計数の可能性を検討した。同時に、赤血球の流速測定も行った。

4.3 節で述べたマイクロ流路やファイバ固定用の微細溝加工と同じ加工条件によって、2 組の検出用小径ファイバを挿入したマイクロ流体デバイスを作製した。図 4-28 は流路とファイバ固定用溝に 2 組の小径ファイバを挿入した部分の SEM 観察写真である。また、図 4-29 は作製したマイクロ流体デバイスをガラス基板側から光学顕微鏡で観察した写真である。小径パイプ流路が合流する位置から 3mm 下流部に第 1 検出用ファイバを配置し、さらに、0.5mm 下流部に第 2 検出用ファイバを配置した。したがって、2 組のファイバの軸間距離は 0.5 mm である。

2 本の投光用ファイバから流路内に波長 532 nm と 405 nm のレーザをそれぞれ照射し、2 本の受光用ファイバでそれぞれ受光し、受光用電子回路を用いてそれぞれのレーザ光を測定した。4.5.1 節と同様な実験方法で血液送液実験を行った。測定した電圧波形を図 4-30 に示す。赤血球が流路内の第 1 検出用ファイバから第 2 検出用ファイバまで流れる時間だけ電圧波形変化の時間差があることがわかる。また図 4-30(a)の結果では、第 1 検出用ファイバによる電圧波形変化は僅かであったが、第 2 検出用ファイバによる電圧波形では変化が大きく現れる場合もあった。図 4-30(b)の結果では、第 2 検出用ファイバによる電圧波形変化から赤血球の重複は確認できるが個々の赤血球を判別しにくい。一方、第 1 検出用ファイバによる電圧波形ではそれぞれの赤血球が明確に確認できる場合があった。これらの結果から、2 組の検出用小径ファイバと 2 種類の波長のレーザを使用することによって、血球計数の精度を向上させられる可能性がある。

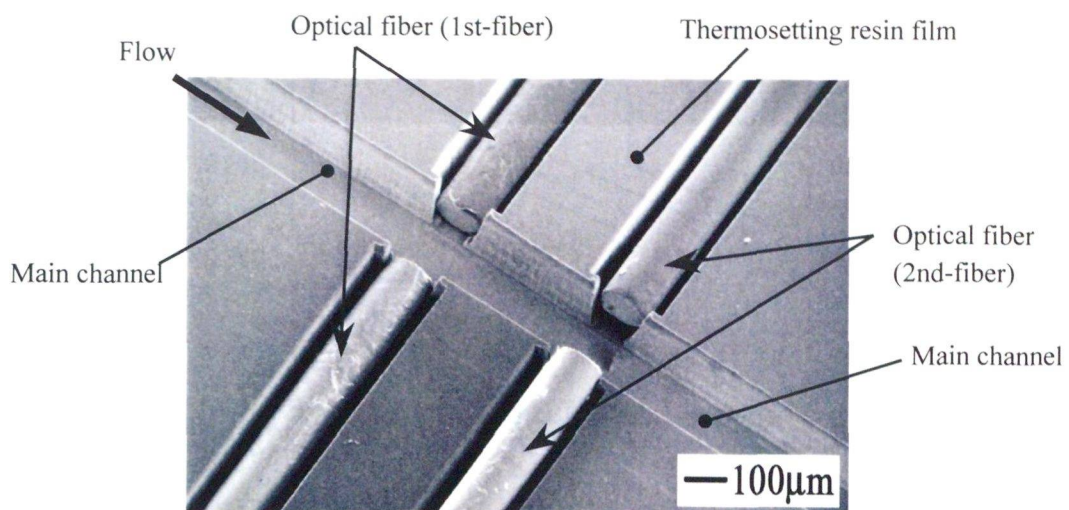


図 4-28 2組の小径ファイバを挿入した3層目までの微細溝のSEM写真

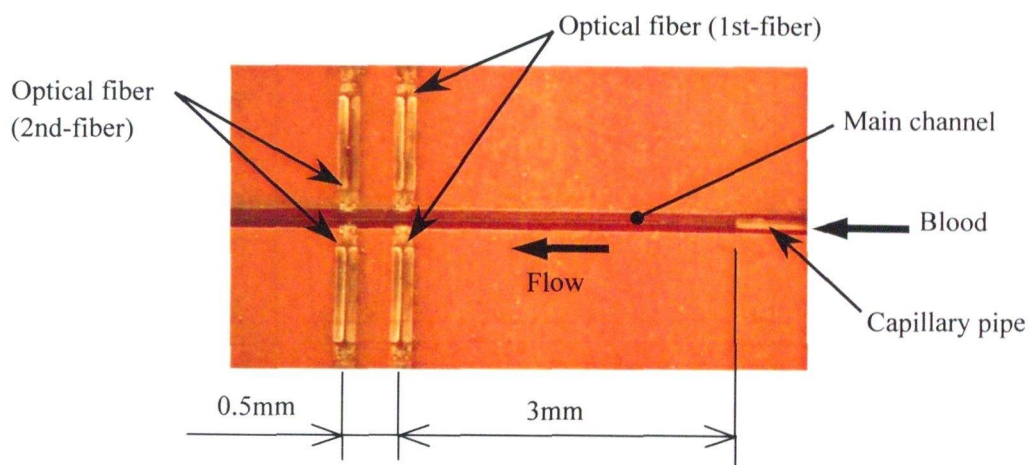
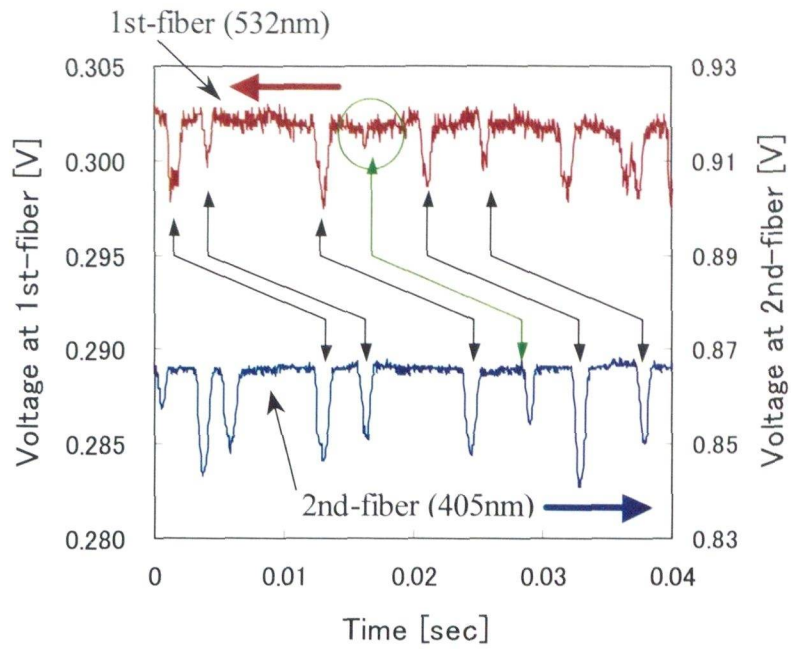
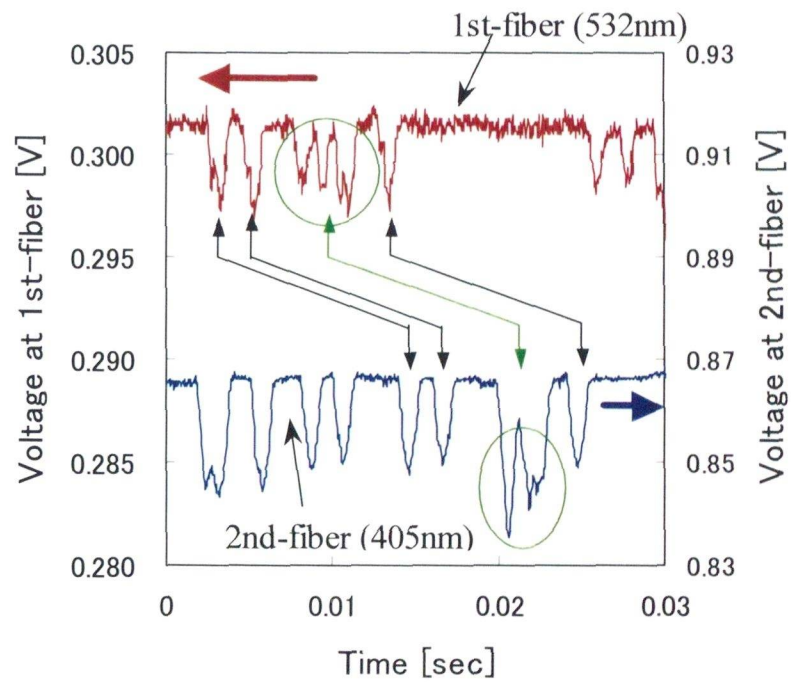


図 4-29 マイクロ流体デバイスにおける小径パイプ流路と2組のファイバをガラス基板側から観察した写真



(a) 同一赤血球検出例



(b) 重なって流れる赤血球検出例

図 4-30 流路内を整理して流れる血球を2組のファイバで検出した電圧波形

次に、赤血球の流速測定について検討した。1つの赤血球が流路内の第1検出用ファイバと第2検出用ファイバ部分を通過した時の電圧波形変化の時間差を測定することによって、赤血球の流速を算出した。受光用電子回路を用いてレーザ光を測定した電圧波形を図4-31に示す。この場合は電圧波形変化の時間差は約11.6msecであり、2組のファイバの軸間距離0.5mmとこの時間から流速を算出した。シリンジポンプによる全流量が $46\text{ }\mu\text{L/min}$ の時に、赤血球の流速は 43 mm/s であった。さらに、顕微鏡と高速ビデオカメラを用いて赤血球を観察した動画をもとに赤血球の流速を概算した結果と、2組のファイバで計測した流速とが一致した。

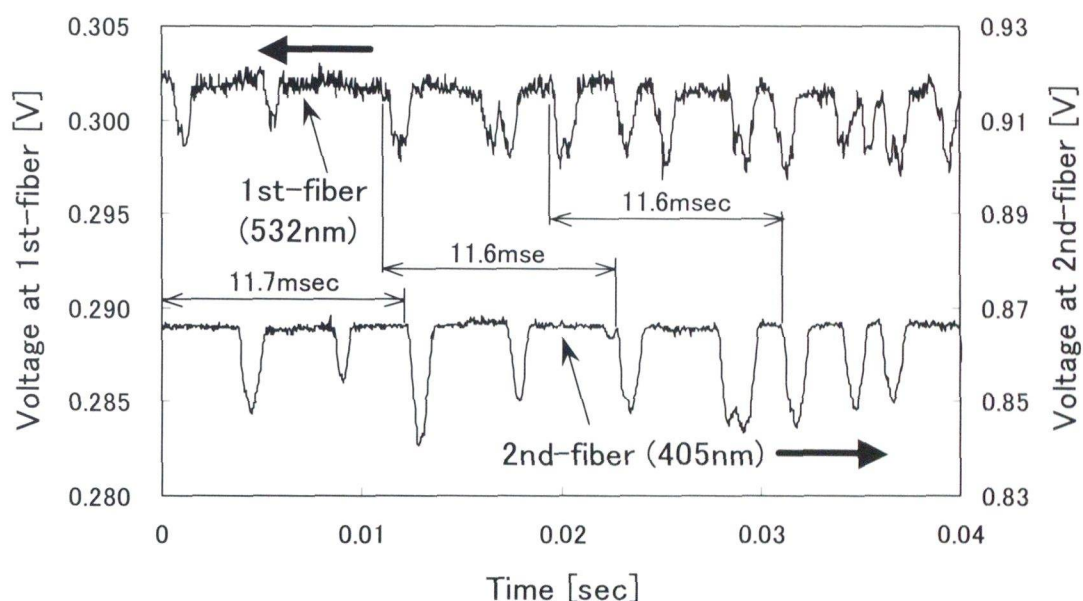


図 4-31 同一の赤血球が2つのファイバ位置を通過する電圧波形変化の時間差

4.6 結言

μ TASにおける検出システムには、微量な流体を扱うため定量性と十分な検出感度が必要であり、同時に、小型化が求められる。そこで、本研究ではマイクロ流路内を整列して流れる血球数を計測するために、小径ファイバとレーザ光を用いた検出システムを考案した。そして、エキシマレーザ加工と樹脂ラミネート法を用いて、血球整列のための小径パイプを挿入したマイクロ流体デバイスに検出のための小径ファイバを挿入することを検討した。さらにレーザ受光用の電子回路を作製し、マイクロ流体デバイスに自己血を送液してマイクロ流路内を流れる血球の検出を行った。結果は以下のとおりである。

①小径ファイバ端面の研磨加工

- ・外径 $140\text{ }\mu\text{m}$ の石英ガラス製バルクファイバの端面を研磨加工した結果、レーザを投光および受光する直径 $50\text{ }\mu\text{m}$ のコア部分では、表面粗さ約 $0.04\text{ }\mu\text{mRa}$ 、約 $1.0\text{ }\mu\text{mPV}$ 、うねり $0.05\text{ }\mu\text{mPV}$ の鏡面加工が得られた。

②小径ファイバを挿入したマイクロ流体デバイスの作製

- ・エキシマレーザ加工と樹脂ラミネート法を用いて、血球検出のための小径ファイバと血球整列のための小径パイプを挿入したマイクロ流体デバイスを作製した。
- ・マイクロ流路およびファイバ固定用溝は良好な形状に加工することができ、デバイスに対する小径ファイバの固定や流路に対するファイバの位置決めが確実にできた。

③受光用電子回路の作製とレーザによる検出予備実験

- ・レーザ受光用回路を作製した。
- ・流路に平均粒径 $10\text{ }\mu\text{m}$ のラテックスビーズを拡散させた純水を送液し、レーザの光路上を小径ビーズが通過する時のレーザ光の変化を測定することにより、小径ビーズの通過による電圧波形の変化を確認することができた。
- ・赤血球の流れの測定では、レーザ光の遮光が小さいため、赤血球の通過による電圧波形の変化が僅かであることがわかった。
- ・以上のデータをもとにレーザ受光用電子回路の改良を行った結果、赤血球が通過した時の電圧波形の変化を確認することができた。

④マイクロ流体デバイスを用いた検出実験

- ・小径ファイバと小径パイプを挿入したマイクロ流体デバイスに血液と生理食塩水を送液し、流路内を流れる血球の検出を試みた。小径パイプから吐出する血液と主流路の生理食塩水との合流部分において、血球の流れが生理食塩水によって全周から絞られ、

血球が一行に並ぶ状態が確認できた。さらに、整列した赤血球が下流部のファイバ位置を通過した時の電圧波形変化を確認することができた。

- ・顕微鏡に取り付けた高速ビデオカメラを用いて赤血球を観察した結果とファイバによる赤血球検出結果とが一致した。さらに、観察した動画をもとに赤血球の流速を概算した結果とファイバで計測した流速とが一致した。
- ・2組の検出用小径ファイバと2種類のレーザを使用することによって、血球計数の精度を向上させる可能性があることがわかった。

以上の結果から、本研究で考案した小径ファイバとレーザ光を用いた検出システムが、赤血球の計数に十分使用できることがわかった。また、ダブルファイバによる検出システムは、今後の血球計数への応用を研究していく段階において、検出精度のような機能向上や性能向上に役立つ技術であると期待できる。本システムは、従来のセルカウンターを非常に小型化できる可能性があり、POCT を目的としたユビキタス血液検査に応用できると考えられる。

参考文献

- 1) Y. K. Cho, J. G. Lee, Y. S. Lee, J. M. Park, B. S. Lee and C. Ko: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, (Tokyo, 2006), 347 (2006)
- 2) Y. Horiike, H. Koda, S.-H.Chang, R. Ogawa, S. Hashioka, M. Nagai and H. Ogawa: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, (Tokyo, 2006), 1558 (2006)
- 3) T. Kamei, M. B. Paegel, R. J. Scherer, M. A Skelley., A. R. Mathies and A. R. Street: *Anal. Chem.*, **75** (20), 5300 (2003)
- 4) 亀井利浩: 産総研 TODAY, **6** (12), 20 (2006)
- 5) T. Kitamori, M. Tokeshi, A. Hibara and K. Sato: *Anal. Chem.*, **76**, 52A-60A (2004)
- 6) 渡慶次学, 馬渡和真, 火原彰秀, 北森武彦: 応用物理学会誌, **73** (6), 741 (2004)
- 7) Y. Matsuoka, Y. Yoshida, M. Tokeshi, A. Hattori, T. Fukuzawa, J. Yamaguchi, K. Uchiyama and T. Kitamori: *Proc. of Micro Total Analysis Systems 2004*, (Malmo, Sweden, 2004), 1, 452 (2004)
- 8) 吉田潤一, 北森武彦ら: マイクロリアクタテクノロジー～限らない可能性と課題～, (株式会社エヌティーエス, 2005)
- 9) E. Maeda, M. Kataoka, Y. Shinohara, N. Kaji, M. Tokeshi and Y. Baba: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, (Tokyo, 2006), 813 (2006)
- 10) 片岡正俊: 産総研 TODAY 2008.04, **8** (4), 24 (2008)
- 11) Y. Sun, L. C. Ng, S. K. Chua, X. M. Zhang, P. Droge, T. C. Ayi, P. H. Yap and A. Q. Liu: *Proc. Int. Conf. Electrical Engineering 2004*, (Sapporo, 2004), 267 (2004)
- 12) U. Larsen, B. Ekberg, M. Jensen: *Proc. of Micro Total Analysis Systems 2004*, (Malmo, Sweden, 2004), 1, 46 (2004)
- 13) T. Ichiki, T. Ujiie, T. Hara, Y. Horiike, and K. Yasuda: *Proc. Micro Total Analysis Systems '01*, (Monterey, 2001), 271 (2001)
- 14) D. P. Schrum, C. T. Cubertson, Jacobson and J. M. Ramsey: *Anal. Chem.*, **71**, 4173 (1999)
- 15) 田邊力也, 秦 誠一, 下河辺 明: 精密工学会誌, **74** (7), 746 (2008)
- 16) K. D. Wood, V. M. Requa and N. A. Cleland: *Rev. Sci. Instrum.*, **78** (10), 104301 (2007)

第5章 結論

本研究では、多品種少量生産が必要となるような場合や μ TASの研究開発におけるマイクロ流体デバイスの製造などにおいて、多種多様な流路形状に対応するためにはレーザ加工が最適であると考え、レーザ加工技術と樹脂ラミネート法を組み合わせたマイクロ流路作製技術を提案しプロセスの最適化と、血液検査用マイクロ流体デバイスへの応用を検討した。主な研究成果は以下のとおりである。UVレーザによるマイクロ加工技術の確立に取り組み、フッ素樹脂に擬似毛細血管流路へ適用可能な微小穴を加工できた。さらに、レーザ加工とラミネート樹脂の積層化によるマイクロ流路加工技術の確立に取り組み、小径パイプや小径ファイバなどの微小部品を組み込んだ3次元立体流路を作製することができた。また、従来のようなポンプや電気泳動力などの流体駆動機器を使用せずにマイクロ流路内の液体を送液する方法として、重力を利用した流体駆動方法を考案した。そして、血液検査用マイクロ流体デバイスへの応用を検討し、血球整列ユニット、血球変形能観察ユニット、流体駆動ユニットなどを集積化したマイクロ流体デバイスを作製し、液体に加わる重力を利用して血液を駆動でき、さらに血球整列と赤血球の擬似毛細血管流路の通過を確認できた。最後に、血球計数を目的として、小径ファイバとレーザ光を用いた検出システムを考案し、流路内を整列して流れる血球を検出することができた。本章では、各章で得られた具体的な研究成果をまとめて総括を述べる。

第2章では、マイクロ加工技術とマイクロ流路作製技術について述べた。本研究では、ポリイミドの熱硬化性ラミネートフィルムと、血液などの生体物質を対象とするため撥水性、耐薬品性、光透過性に優れたフッ素樹脂に注目した。しかし、フッ素樹脂はレーザ加工、切削加工、エッチング加工など多くのマイクロ加工において、一般的に加工が難しい材料である。そこで、これらの材料に対してUVレーザによるマイクロ加工技術の検討を行った。さらに、マイクロ流路の作製を行い、プロセスの最適化を行った。以下の結果が得られた。

(a)レーザによる熱硬化性ラミネートフィルムへのマイクロ加工技術

フルエンスと加工深さとの関係や、レーザ照射パルス数と加工深さとの関係など、熱硬化性ラミネートフィルムに対するエキシマレーザ加工条件についての最適化を行った。必要に応じた断面形状や深さの微細溝を作製でき、血液検査用流路として適用可

能な加工面粗さの微細溝が得られた。これによって、三又構造の微細溝、幅が変化する微細溝、深さが変化する微細溝などが加工可能となり、簡易にマイクロ流路となる微小空間を形成できる新しい加工技術を実現した。

(b) レーザによるフッ素樹脂へのマイクロ加工技術

波長 248nm に比べて波長 193nm のエキシマレーザは、加工形状のコントロールが容易であることを明らかにした。次に、3種類のフッ素樹脂材料を比較した結果、PFAとFEPでは流路を形成することが難しく、EFEPでは流路の形成が可能であることを示し、EFEPへの加工ではアスペクト比が1前後の穴形状ではレーザ照射パルス数と加工深さとが比例関係となるような加工条件を得ることができた。これらによって、従来は加工が困難であったフッ素樹脂フィルムに、マイクロ流路となる微小空間を形成するための微細溝や微小穴の高精度加工を実現した。

さらに、微小径の穴加工や微細溝加工では、穴が貫通するまでは加工面粗さは悪いが、穴が貫通した後のレーザ照射回数を増加させることにより、穴側面が少しずつ除去されていき、穴側面の加工面荒れが小さくなることを見出した。この効果によって、流路として適用可能な加工面粗さの微細溝や微小穴の加工技術を確立した。

(c) フッ素樹脂フィルムへのレーザ加工面の評価

レーザ加工面の評価を行った結果、FTIRによる測定および濡れ性試験では、加工後の特性変化がないことを確認した。この結果から、レーザ加工によってフッ素樹脂の特性を有したマイクロ流路を作製可能であることを示した。

(d) マイクロ流路の作製技術

熱硬化性ラミネートフィルムの積層とレーザ加工によるマイクロ流体デバイスの作製プロセスを考案し、さらにフッ素樹脂フィルムと熱硬化性ラミネートフィルムとの積層とレーザ加工によるマイクロ流体デバイスの作製プロセスを考案した。熱硬化性樹脂を用いることによって流路壁面が変形することなく、流路となるマイクロ空間を形成することができた。一方、フッ素樹脂フィルムは熱可塑性樹脂であるが、樹脂ラミネート法において、流路の天井と底面を形成している上下のフィルムの変形を $2\mu\text{m}$ 以下にすることができた。この方法によって、用途に応じた複数の材料で形成される3次元立体流路をもつマイクロ流体デバイスの作製技術を新たに開発した。

第3章では、2章で検討したマイクロ加工技術とマイクロ流路作製技術をもとに、血液検査用 μ TASの構成要素となる数種類のマイクロ流体デバイスを作製し、それぞれに自己血を流し血球の観察を行った。以下の結果が得られた。

①三又構造マイクロ流路および小径パイプ挿入マイクロ流路を用いた血球整列

流路深さが $45\mu\text{m}$ である三又構造マイクロ流路を用いて血液送液実験を行った結果、サイド支流路の生理食塩水の圧力を高くすることによって三又構造流路の合流位置で血液の流れ幅が絞られた状態で流れることが確認できた。次に、CAEを用いて外径 $100\mu\text{m}$ の小径パイプを挿入した流路の設計を行い、エキシマレーザ加工、微細放電加工、樹脂ラミネート法によって小径パイプ流路を持つマイクロ流体デバイスを作製した。血液送液実験を行った結果、血液と生理食塩水の合流部分において、血球の流れが生理食塩水によって全周から絞られ、血球が流路に対して一直線上に流れていることが確認できた。これによって、微小部品を組み込んだマイクロ流路を作製することが可能となり、より多様な形状のマイクロ流路を作製する技術を新たに開発した。また、この血球整列用マイクロ流路は、血球を検出する技術と組み合わせることによって血球計数デバイスの超小型化を実現することができる技術であると考えられる。

②フッ素樹脂を用いた血球変形能観察用マイクロ流体デバイス

厚さ $100\mu\text{m}$ のフッ素樹脂EFEPのフィルムに入口の直径が $20\mu\text{m}$ で、出口の直径が $5\mu\text{m}$ の微小穴をレーザで加工した。赤血球の直径の1/10に近い値まで加工表面をなめらかにすることができ、目標とした擬似毛細血管の流路が得られた。この加工技術によって、従来は加工が困難であったフッ素樹脂をマイクロ流体デバイスに適用することが可能となり、撥水性、耐薬品性、光透過性に優れたマイクロ流体デバイスを実現できた。

次に、赤血球の変形を観察することを目的とした擬似毛細血管流路をもつマイクロ流体デバイスを作製し、血液送液実験を行った。その結果、直径約 $8\mu\text{m}$ の赤血球がその変形能により出口直径 $5\mu\text{m}$ の擬似毛細血管流路を詰まることなく通過することが確認できた。本デバイスによって、マイクロ流路内における赤血球の変形が実現でき、血球変形能測定デバイスへの可能性を示した。

③重力を利用した流体駆動方法と血球整列

三又構造マイクロ流路をもつマイクロ流体デバイスを使用し、送液用の小径チューブ、または生理食塩水および血液用リザーバを上方に位置することによって、小径チュー

ブヤリザーバ内の液体に加わる重力によって、流路内の液体を駆動できることが、C A E および血液送液実験によって確認できた。さらに、血球を整列させることを目的として、三又構造流路をもつ重力駆動部集積型マイクロ流体デバイスにおける流路形状の最適化を行った。その結果、重力駆動によって血液の流れ幅を平均 $7\mu\text{m}$ に絞ることができ、血球の最大流速は約 3mm/s が得られた。本技術によって、従来のようなポンプなどの大型の流体駆動機器を使用した場合よりも、非常に微量な液体試料で送液が可能となり、さらに流体駆動ユニットをチップ内に集積化でき、 μTAS の更なる小型化を可能にする技術を開発した。

④複合流路における重力駆動と血球変形能観察

三又構造流路と擬似毛細血管流路を複合したマイクロ流路から構成され、重力駆動を利用した赤血球変形能観察用マイクロ流体デバイスを作製した。チップを垂直な状態にすることによって、直径約 $8\mu\text{m}$ の赤血球が重力の力によって出口直径 $5\mu\text{m}$ の擬似毛細血管流路を詰まることなく通過することが確認できた。さらに赤血球が擬似毛細血管流路に対して同一方向から流入し、同一方向へ流出することによって、赤血球が擬似毛細血管流路を通過する時に発生する血球の衝突や干渉を軽減することができた。本技術によって、 $60\text{mm}\times 24\text{mm}\times 0.6\text{mm}$ のチップに3種類のユニットを集積化でき、本技術は各種機能を有する数種類のデバイスから構成される血液検査用 μTAS の開発を実現する上で不可欠な集積化技術である。

第4章では、血球計数デバイスの開発について述べた。3章で検討したマイクロ流体デバイスにおいてマイクロ流路内を整列して流れる血球数を計測するために、本研究では小径ファイバとレーザ光を用いた検出システムを考案した。血球検出用マイクロ流体デバイスとレーザ受光用電子回路を作製し、マイクロ流路内を流れる血球の検出を試み、本システムによる血球計数の可能性について検討した。以下の結果が得られた。

(i) 小径ファイバを挿入したマイクロ流体デバイスの作製

外径 $140\mu\text{m}$ の石英ガラス製バルクファイバの端面研磨加工を検討し、コア部分では表面粗さ約 $0.04\mu\text{mRa}$ 、約 $1.0\mu\text{mPV}$ 、うねり $0.05\mu\text{mPV}$ の鏡面が得られた。次に、エキシマレーザ加工と樹脂ラミネート法を用いて、血球検出のための小径ファイバと血球整列のための小径パイプを挿入したマイクロ流体デバイスを作製した。マイクロ流路およびファイバ固定用溝は目標とする形状に加工することができ、デバイスに対

する小径ファイバの固定や流路に対するファイバの位置決めも確実にできた。本手法によって、検出部分の小型化が実現できた。

(ii)小径ファイバとレーザ光による血球検出

レーザ受光用電子回路を作製し、小径ファイバと小径パイプを挿入したマイクロ流体デバイスに自己血と生理食塩水を送液し、流路内を流れる血球の検出を試みた。小径パイプから吐出する血液と主流路の生理食塩水との合流部分において、血球の流れが生理食塩水によって全周から絞られ、血球が一行に並ぶ状態が確認できた。さらに、整列した赤血球が下流部のファイバ位置を通過した時の電圧波形変化を確認することができた。これによって、従来の研究例のような流路外部やデバイス外部からの検出方法ではなく、チップ内に配置した小径ファイバとレーザ光を用いて、整列して流れる赤血球を流路内で検出するシステムを新たに開発した。

(iii)ダブルファイバによる検出システム

2組の検出用小径ファイバを挿入したマイクロ流体デバイスを作製した。波長 532 nm, 405 nm のレーザとこのデバイスを使用して、整列して流れる赤血球を検出する実験を行った。その結果、顕微鏡に取り付けた高速度ビデオカメラを用いて赤血球を観察した結果とファイバによる赤血球検出結果とが一致していることが確認でき、さらに、赤血球の流速測定に関する結果も一致していることが確認できた。このダブルファイバによる検出システムは、今後の血球計数への応用を研究していく段階において、検出精度のような機能向上や性能向上に役立つ技術であると期待できる。また、ファイバの配置やレーザ波長を今後検討し、他の検出にも応用することによって、カウント以外の血球分析などへの発展が期待される。

以上のように、本研究では新しいマイクロ流路作製技術を提案し加工プロセスの最適化と、血液検査用マイクロ流体デバイスへの応用の可能性を示した。レーザによるマイクロ加工技術の最適化、およびレーザ加工と樹脂ラミネート法を用いた3次元立体流路作製技術は、高速・高精度な加工ができマイクロ流路設計における自由度も向上し、高機能なマイクロ流体デバイスの実用化につながる重要なプロセスである。また、ラミネートフィルムや一般的に加工が困難であるフッ素樹脂フィルムへのマイクロ加工技術と、フィルムを積層する樹脂ラミネート法とを活用することによって、流路ごとに用途に応じた材料を選択できるようになった。この作製技術は高機能なマイクロ流体デバイスの実用化につな

る重要なプロセスである。さらに、これらの技術をもとに作製した数種類のマイクロ流体デバイスは、小型・高精度な血液検査システムに適用可能であることが見出され、今後は医療分野への応用を検討したい。そして、血球を整列させて流すことができるマイクロ流路と本研究で考案した小径ファイバとレーザー光を用いた検出システムは、本研究以外にも幅広く応用できる技術であり、将来の発展が期待できる。また、赤血球の変形を観察できる擬似毛細血管流路は、血液検査の1つである血球変形能測定への応用が可能である。また、本研究で考案した重力を利用した流体駆動技術は、非常に微量な液体試料で送液することができ、さらに流体駆動ユニットをマイクロ流体デバイス内に集積することができるため、在宅医療の発展やPOCT (Point of care testing) の発展には欠かせない技術であると考えられる。

本研究の成果は、高度医療技術を支える医療用 μ TASの研究開発において広く活用でき実用化を促進する技術として寄与でき、また、化学やバイオをはじめとする様々な応用分野における研究開発にも役立てることができると考えられる。しかし、まだ課題は残されており、今後はデバイスの生産性、検査用周辺装置の小型化、実検査による評価、生体適合性などをはじめとする課題に取り組みたい。これにより本研究の成果は、今後の技術発展に貢献できると期待される。

謝辞

本研究の遂行と本論文のまとめにあたり、東洋大学 吉田善一教授には終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました。ここに深甚なる感謝の意を表します。

また、東洋大学 前川透教授、東洋大学 寺田信幸教授には、本研究の当初より多大な御指導と御助言を賜り、深く感謝の意を表します。

本研究は、東洋大学と山梨県工業技術センターにおいて研究を行った成果をまとめたものであり、本研究の実施にあたり、同センター 殿岡日吉所長、乙黒親男副所長、藤原和徳部長には、数々のご支援とご尽力をいただき、深く感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、同センター 萩原茂博士、岩間貴司研究員、小松利安研究員、勝又信行研究員、木島一広研究員、寺澤章裕研究員には、多大なご協力とご教示をいただき、厚く御礼申し上げます。

なお、東洋大学大学院 卒業生 田原烈氏、山田潤氏、および在学生 廣木聖氏、岸野篤氏には、研究の推進にあたりご協力をいただき、御礼申し上げます。

業績一覧

【原著論文】

- 1) H. Yamada, Y. Yoshida, N. Terada, S. Hagihara, T. Komatsu and A. Terasawa: “Fabrication of gravity-driven microfluidic device”, Rev. Sci. Instrum., **79** (12), 124301 (2008)
- 2) 山田博之, 吉田善一, 寺田信幸, 萩原 茂, 寺澤章裕: “レーザによるフッ素樹脂への血球変形能観察用マイクロ流路の加工”, 精密工学会誌, **73** (9), 1035-1039 (2007)
- 3) H. Yamada, Y. Yoshida and N. Terada: “Blood Cell Counter in Gravity-Driven Microchannel”, Jpn. J. Appl. Phys., **44** (12), 8739-8741 (2005)
- 4) 山田博之, 吉田善一, 寺田信幸, 田原 烈, 山田 潤: “レーザ加工によるラミネート樹脂製血液検査用マイクロ流体デバイスの作製”, レーザ加工学会誌, **12** (4), 244-248 (2005)
- 5) 寺田信幸, 山田博之, 吉田善一: “血液検査用マイクロ流体デバイスの作製”, 生体医工学, **43** (4), 785-789 (2005)

【学会発表／講演／ポスター発表】

- 1) 山田博之, 吉田善一, 寺田信幸, 萩原茂, 小松利安, 寺澤章裕: “レーザによる血球計数用マイクロ流体デバイスの作製”, 2008 年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集, 543-544 (2008)
- 2) 岸野 篤, 山田博之, 寺田信幸, 吉田善一: “マイクロ流路への微小量血液の導入方法に関する検討”, 2008 年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集, 545-546 (2008)
- 3) 山田博之, 萩原 茂, 小松利安, 寺澤章裕, 吉田善一, 寺田信幸: “マイクロ分析システムに関する研究”, 平成 20 年度やまなし産学官連携研究交流事業研究内容要旨集, 3 (2008)
- 4) H. Yamada, Y. Yoshida and N. Terada: “Fabrication of Gravity Driven Microchannel for Blood Test by Laser Ablation”, The 5th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology (International Symposium - Bio-Nano Electronics Research Centre Toyo University -), (2007)
- 5) 山田博之, 萩原 茂, 寺澤章裕, 吉田善一, 寺田信幸: “マイクロ分析システムに関する研究”, 平成 19 年度山梨県・山梨大学連携研究公開事業研究内容要旨集, 1 (2007)
- 6) H. Yamada, Y. Yoshida and N. Terada: “Fabrication of a Micro-Fluidic Device for Blood Test by Laser Ablation”, The 4th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology (International Symposium - Bio-Nano Electronics Research Centre Toyo University -), (2006)

- 7) 山田博之, 吉田善一, 寺田信幸, 萩原茂, 寺澤章裕: “レーザによるフッ素樹脂へのマイクロ流路加工”, 2006 年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集, 589-590 (2006)
- 8) 山田 潤, 吉田善一, 寺田信幸, 山田博之: “レーザとラミネートを用いた血球計測マイクロ流体デバイスの作製Ⅱ”, 2006 年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集, 591-592 (2006)
- 9) 山田 潤, 田原 烈, 吉田善一, 寺田信幸, 山田博之: “レーザとラミネートを用いた血球計測マイクロ流体デバイスの作製”, 2006 年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集, 1233-1234 (2006)
- 10) 山田博之, 吉田善一, 寺田信幸, 田原 列, 山田 潤: “レーザとラミネートによる血液検査用マイクロ流体デバイスの作製”, 第 63 回レーザ加工学会講演論文集, 173-178 (2005)
- 11) 山田博之, 吉田善一, 寺田信幸, 藤原和徳, 勝又信行: “エキシマレーザ加工による血液検査用マイクロ流体デバイスの作製”, 2005 年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集, 571-572 (2005)
- 12) 田原 烈, 山田 潤, 吉田善一, 寺田信幸, 山田博之: “レーザによる赤血球変形能測定をするマイクロ流体デバイスの作製”, 2005 年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集, 573-574 (2005)
- 13) 山田 潤, 田原 烈, 吉田善一, 山田博之, 寺田信幸: “レーザとラミネートを用いた砂時計型血球計測デバイスの開発”, 2005 年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集, 569-570 (2005)
- 14) H. Yamada, Y. Yoshida and N. Terada: “Blood Cells Counter in a Gravity-Driven Micro-channel”, The 2nd International Symposium on Bioscience and Nanotechnology (International Symposium - Bio-Nano Electronics Research Centre Toyo University-), (2004)
- 15) 田原 烈, 山田 潤, 根市 勉, 吉田善一, 寺田信幸, 山田博之: “マイクロ流体を利用した血液計測” 2004 年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集, 529-530 (2004)
- 16) 吉田善一, 田原 烈, 山田博之, 寺田信幸: “レーザによるマイクロ流体デバイスの作製” 2003 年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集, 315 (2003)
- 17) 平 晋一郎, 吉岡正人, 吉田善一, 中村武房, 山田博之: “ふっ素樹脂の微細加工に関する基礎研究” 2003 年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集, 180 (2003)

【解説論文】

- 1) 山田博之, 吉田善一, 寺田信幸: “レーザによる赤血球変形能観察用マイクロ流体デバイスの作製”, レーザ加工学会誌, **15** (1), 28-34 (2008)
- 2) 山田博之, 吉田善一, 寺田信幸: “レーザ加工のメディカルへの応用の可能性—血液検査用マイクロ流体デバイスの作製—”, レーザ協会誌, **32** (1), 16-24 (2007)

【特許】

- 1) 特願 2004-194980 「マイクロ流体素子を用いた分析装置又は分析方法」 山田博之, 吉田善一, 寺田信幸

